

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di dottorato in scienze Biomediche, Cliniche e Sperimentali

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE L. SACCO

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

MALATTIE INFETTIVE

CICLO XXIV

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

INFLUENZA DEI POLIMORFISMI DI *IL-28B* e *SLC29A1*

SULLA RISPOSTA ALLA TERAPIA

CON INTERFERONE PEGILATO E RIBAVIRINA

IN PAZIENTI COINFETTI HIV-HCV

MED/17

Tesi di dottorato di:

Donatella **MISCIAGNA**

TUTOR

Dr. Agostino **RIVA**

COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Massimo **GALLI**

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1.1. Storia ed eziologia.....	4
1.1.2. Modalità di trasmissione	7
1.1.3. Incidenza e prevalenza.....	9
1.1.4. Storia naturale	10
1.2. COINFEZIONE HIV-HCV	23
1.2.1. Epidemiologia.....	24
1.2.2. Storia naturale della coinfezione	25
1.2.3. Trattamento dell'infezione da HCV in pazienti coinfecti	27
1.3. GENETICA DELL'OSPITE NELL'INFEZIONE DA VIRUS C	31
1.3.1. Introduzione: ruolo della genetica dell'ospite nelle malattie infettive.....	31
1.3.2. I GWAS	31
1.3.3. Importanza della genetica dell'ospite nell'infezione da virus C	32
1.3.4. IL-28B	33
1.3.5. SLC29A	40
2. SCOPO DELLA TESI.....	44
3. MATERIALI E METODI	45
3.1. Pazienti	45
3.2. Separazione di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs) con tecnica di gradiente di densità (FICOLL).	45
3.3. Estrazione di DNA genomico da PBMC	46
3.4. Estrazione di RNA da PBMC e sintesi di cDNA.....	46
3.5. Genotipizzazione tramite PCR real time	46
3.6. Analisi dell'espressione genica.....	48
3.7. Analisi statistica.....	48
4. RISULTATI	51
4.1. Caratteristiche dei pazienti	51
1.1. Genotipizzazione	53
4.4. Analisi della risposta alla terapia anti-HCV.	58
4.5. Risposta precoce	62

4.6. Espressione dei geni IL28A e IL28B.....	64
5. DISCUSSIONE	70
Bibliografia.....	76

1. INTRODUZIONE

1.1. Infezione da virus C

L'infezione da virus dell'Epatite C (HCV) è oggi la causa o concausa più frequente di malattia cronica del fegato, di cirrosi e di epatocarcinoma nel mondo occidentale.

L'epidemiologia dell'infezione da HCV si è significativamente modificata nell'ultimo decennio, in particolar modo in seguito all'identificazione del virus nel 1989, del conseguente sviluppo delle metodologie diagnostiche per rilevare l'infezione, ed anche della progressiva adozione di misure di protezione e profilassi nei gruppi e nelle procedure a maggior rischio. Attraverso questi interventi, l'incidenza di nuovi casi di infezione si è progressivamente ridotta nei paesi occidentali, mentre la prevalenza dei portatori cronici nella popolazione generale resta in molte aree ancora elevata per la presenza di coorti di soggetti infettati in era pre-sierologica, ai quali si aggiungono casi di infezione più recente.

Il rilievo clinico che l'infezione cronica da HCV esita in complicanze epatiche gravi solo in un limitato sottogruppo di infettati, non è purtroppo di conforto. Infatti, le attuali stime di 150-180 milioni di portatori cronici di HCV nel mondo (dei quali circa 1,5 milioni in Italia e 5-10 milioni in Europa) portano ad una previsione di incremento significativo delle complicanze epatiche (cirrosi scompensata, epatocarcinoma) nei prossimi 10-20 anni, in assenza di interventi terapeutici efficaci.

1.1.1. Storia ed eziologia

La storia dell'epatite C è giovane, non ha più di trent'anni. Scoperta dopo lo sviluppo, negli anni '70, di test sierologici per la diagnosi delle infezioni da parte dei virus dell'epatite A e dell'epatite B, divenne infatti evidente che la maggior parte dei casi delle epatiti post trasfusionali dovevano essere causate da un altro agente eziologico. In considerazione di ciò si parlava dunque di "Epatite non-A non-B". Nel corso degli anni '80 si arrivò poi ad identificare il virus specifico responsabile di queste forme di epatiti, il quale venne chiamato Virus dell'epatite C. [1]

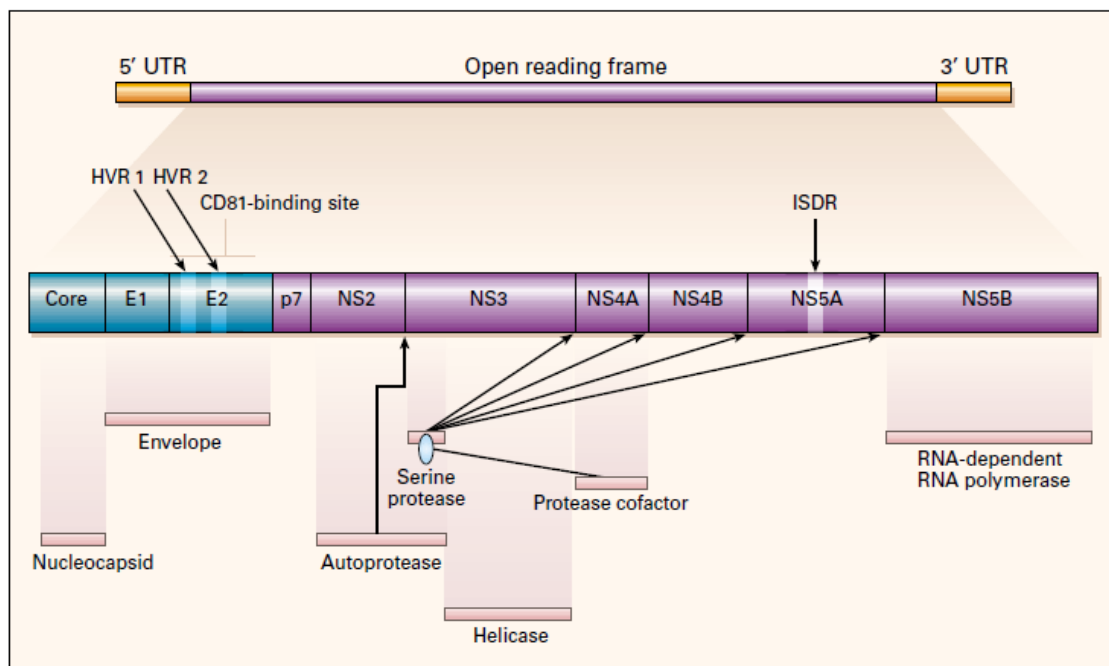
L'HCV è stato classificato tra gli Hepacivirus, un genere della famiglia dei Flavivirus. Il virione di HCV consiste in una particella sferoidale, di circa 50 nm di diametro, costituita da un core proteico rivestito da un envelope lipo-proteico.

Il genoma di HCV è costituito da una molecola di RNA a singola elica (ssRNA), a polarità positiva, di 9400 ribonucleotidi.[2] [3] Quasi l'intero genoma virale è occupato da una lunga sequenza codificante, *open reading frame* (ORF), da cui viene sintetizzata un'unica poliproteina di 3011[4] aminoacidi che verrà poi processata a livello co- e post- traduzionale da proteasi cellulari e virali in 10 diversi prodotti proteici. In 5' e 3' sono presenti regioni altamente conservate non tradotte (5' UTR e 3' UTR, rispettivamente).

L'ORF di ogni diverso genotipo di HCV ha una lunghezza differente: il genotipo 1 è lungo 9400 basi, il 2 generalmente 9099 nucleotidi e il 3 9063 basi. [5]

Il virus HCV presenta nella porzione N-terminale tre proteine a funzione strutturale (core-C, envelope-E1 e E2/NS1) e nella porzione C-terminale quattro proteine non strutturali (NS2, NS3, NS4, NS5), ma fondamentali per la replicazione virale [6][7] La regione 5' UTR, è lunga 341 basi, anche se di recente sono stati identificati altri otto nucleotidi. E' la regione più conservata di tutto il genoma ed infatti è stata utilizzata per sviluppare test diagnostici per HCV-RNA.

Figura 1: il genoma di HCV e le poliproteine espresse



La replicazione di HCV avviene nel citoplasma. Il ciclo replicativo di HCV può essere riassunto nei seguenti punti: 1. Entrata nella cellula ospite e liberazione dell'RNA virale genomico nel citoplasma; 2. Traduzione dell'RNA, processamento della poliproteina virale e formazione di un complesso replicasico associato alle membrane intracellulari; 3. Utilizzo

dell'RNA positivo per la sintesi di un intermedio a RNA negativo e per la produzione di nuove molecole di RNA positive con diversa destinazione; 4. Rilascio in circolo di progenie virale dalle cellule infettate.

HCV replica per lo più, a livello del citoplasma degli epatociti, anche se sembra infettare anche i linfociti. [8] La produzione giornaliera di virioni in un portatore cronico di HCV sembrerebbe piuttosto elevata, compresa tra 10^{10} e 10^{12} (superiore quindi rispetto a quella che si riscontra nel caso di infezione da HIV); i virioni vanno incontro a rapido turnover nel torrente circolatorio, con un'emivita di circa 2-3 ore.

La rapidità della replicazione virale unitamente all'incapacità, comune a tutti i virus a RNA, di riparare gli errori di incorporazione nucleotidica, rendono conto del fatto che il genoma di HCV sia molto frequentemente soggetto a mutazioni. In conseguenza di ciò possiamo dire che HCV circoli nel singolo individuo non come singola specie ma sotto forma di "quasispecie", ovvero come popolazione eterogenea di virioni che differiscono tra loro per l'1-5% della sequenza nucleotidica.

L'eterogeneità genetica di HCV e la sua capacità di mutazione genotipica sono probabilmente coinvolti nella frequente cronicizzazione dell'infezione, nell'evasione da parte del virus alla risposta immunitaria, nella limitata efficacia della terapia e nella difficoltà di preparare un vaccino. [9]

Questa variabilità genomica ha portato alla distinzione di sei diversi genotipi, caratterizzati da un'omologia di sequenza all'interno di ogni singolo gruppo del 65%, entro i quali si identificano diversi sottogruppi, dove l'omologia è superiore al 90%. Questi sottogruppi vengono identificati rispettivamente con i numeri arabi e con le lettere minuscole.

I genotipi 1, 2 e, in misura minore 3, sono quelli maggiormente diffusi in Europa e negli Stati Uniti. In Italia l'infezione da parte dei genotipi 1, 2 e 3 copre oltre il 90% dei casi di infezione da HCV, mentre più frequente sta diventando il riscontro dell'infezione da genotipo 4, diffusa in particolari etnie emigranti.

La determinazione del genotipo virale può avere una notevole rilevanza pratica, in quanto i vari genotipi presentano una diversa sensibilità alla terapia antiretrovirale e la loro

caratterizzazione costituisce un elemento importante nella decisione terapeutica e nelle scelte di gestione clinica.

1.1.2. Modalità di trasmissione

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) si trasmette molto efficacemente attraverso la via parenterale. Nei paesi industrializzati la diffusione di questo virus è stata favorita da due grandi focolai epidemici sviluppatasi nella seconda metà del ventesimo secolo. Il primo focolaio ha coinciso con l'uso estensivo di terapie parenterali e trasfusioni di sangue (90% delle infezioni), mentre il secondo è stato determinato dal crescente diffuso impiego di iniezione di sostanze stupefacenti da parte della popolazione tossicodipendente. [10] [11]

Oggi, nei paesi occidentali, l'epidemia di HCV da causa iatrogena (trasmessa cioè attraverso pratiche mediche o chirurgiche) è da considerarsi in fase di conclusione, grazie a due fattori chiave: il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie (abolizione dell'uso delle siringhe in vetro, impiego di materiale sanitario monouso) e, soprattutto, la disponibilità di test di laboratorio efficaci per la selezione di donatori di sangue. La ricerca dell'HBsAg tra i donatori di sangue e l'eliminazione dei donatori a pagamento nei primi anni '70 ha ridotto, ma non completamente eliminato, l'incidenza dell'epatite post-trasfusionale. Negli anni '70 la probabilità di contrarre un'epatite da trasfusione di sangue HbsAg negativo proveniente da donatori volontari era di circa il 10% per paziente. Il 90-95% di questi casi veniva classificato, in base a esami sierologici che escludevano la presenza di HBV o HAV, come epatite non-A non-B. Per i pazienti che necessitavano di trasfusioni di emoderivati, come i fattori della coagulazione, il rischio era più elevato, fino al 20-30%. Negli anni 80 l'autoesclusione volontaria dei donatori di sangue con fattori di rischio per l'AIDS e, successivamente, l'introduzione dello screening dei donatori di sangue mediante ricerca degli anticorpi anti HIV hanno ulteriormente ridotto il rischio di sviluppare un'epatite post trasfusionale (5%).

Il rischio di ricevere un'unità di sangue potenzialmente infetta è così sceso a circa 0,3 per milione di unità trasfuse, un valore ben diverso dal 2% osservato prima dell'introduzione del test. La situazione è molto diversa nei paesi più poveri, dove le principali vie di trasmissione sono ancora oggi la trasfusione di sangue infetto e l'uso di materiale sanitario contaminato.

Attualmente, grazie all'utilizzo dei test per la ricerca degli anticorpi anti-HCV oltre che dell'HCV RNA il rischio di epatite C post trasfusionale è minimo e pari a circa 1 ogni 100000. [12] [13]

La diffusione tra tossicodipendenti rappresenta ad oggi la principale via di trasmissione del virus, almeno nei paesi sviluppati a causa dell'uso di aghi o siringhe contaminati. Globalmente il 50-95% dei soggetti che ammettono l'uso di stupefacenti per via endovenosa è positivo per anticorpi anti HCV. [14] [15]

Il rischio di trasmissione dell'infezione a seguito di puntura con ago contaminato è del 2% ed è intermedio tra il rischio di trasmissione di HIV (circa 0,3%) e di HBV (30%). [16] Nonostante ciò la prevalenza dell'infezione tra il personale sanitario è assolutamente sovrapponibile a quella della popolazione generale. [17]

La trasmissione sessuale è rara e non quantificabile sul piano epidemiologico. In generale l'associazione tra comportamenti sessuali a rischio e HCV è molto più debole di quella con HIV o HBV. [18]

Nel contesto di relazioni sessuali stabili nelle quali uno dei partner sia portatore di HCV, l'uso del profilattico allo scopo di prevenire la trasmissione dell'infezione non è raccomandato. Il contagio perinatale si verifica in circa il 5% dei bambini nati da madri HCV-RNA positive. Il rischio è aumentato in presenza di coinfezione HIV, probabilmente per i livelli maggiori di HCV-RNA nella gravida, derivanti dall'immunodepressione HIV correlata. [22]

Non vi è ad oggi alcuna evidenza che le modalità del parto (per vie naturali o attraverso parto cesareo) e il tipo di allattamento (naturale o artificiale) influenzino il rischio di trasmissione. Non sono pertanto raccomandate la prescrizione di taglio cesareo e di allattamento artificiale per tutte le madri portatrici dell'infezione, a meno che non sia presente una infezione da HIV.

Nonostante non vi sia alcuna evidenza di trasmissione di HCV in ambito familiare o di convivenza in assenza di esposizione parenterale, alcuni studi hanno evidenziato un incremento della frequenza di positività anti-HCV tra i familiari dei soggetti con infezione. Questa associazione, che si ritiene per lo più imputabile alla condizione di fattori di rischio, è alla base della raccomandazione di sottoporre al test anti-HCV i conviventi dei parenti con epatite C.

Meno comunemente il virus si trasmette a seguito di trattamenti estetici, come piercing e tatuaggi eseguiti con strumenti non adeguatamente sterilizzati. Fra le altre possibili modalità di trasmissione del virus per via parenterale ricordiamo la morsicatura da soggetto infetto, le scarificazioni cutanee rituali, l'agopuntura, le pratiche di manicure o pedicure con strumenti non sterilizzati, la rasatura dal barbiere. [18]

1.1.3. Incidenza e prevalenza

Le attuali stime indicano in 150-180 milioni i portatori cronici di infezione da HCV nel mondo, e in particolare 5-10 milioni in Europa.

Bisogna comunque ricordare che esistono alcune aree geografiche in cui la prevalenza dell'infezione è particolarmente elevata. In Egitto per esempio dal 10% al 30% della popolazione è HCV sieropositivo [20] ed elevati tassi di sieropositività sono stati riscontrati anche in alcune regioni del Giappone [21], Taiwan e Italia [22]. In tali zone l'infezione è diffusa per lo più in adulti e anziani e questo suggerisce come si sia trasmessa anni fa attraverso pratiche ormai cadute in disuso, prima tra tutte ad esempio l'abitudine diffusa in passato ad utilizzare materiale non a perdere per le pratiche iniettive [23].

Figura 2: Prevalenza dell'infezione da HCV



Per l'Italia le stime più accreditate riportano una prevalenza di circa il 3%, con una frequenza di HCV che però risulta variabile a seconda dell'area geografica considerata. Frequenze maggiori si osservano nel Centro (8%) e al Sud (12-16%) rispetto al Nord (2-3%). Più del

50% dei soggetti anti HCV positivi sono viremici, ossia HCV-RNA positivi, e pertanto portatori cronici dell'infezione.

La prevalenza d'infezione HCV in Italia correla fortemente con l'età, secondo un "effetto coorte": raggiunge cioè punte particolarmente elevate (oltre il 30%) nella popolazione anziana di alcune regioni del Sud Italia. Nei bambini e negli adolescenti la prevalenza di anti-HCV positivi è al contrario molto bassa (0.4%).

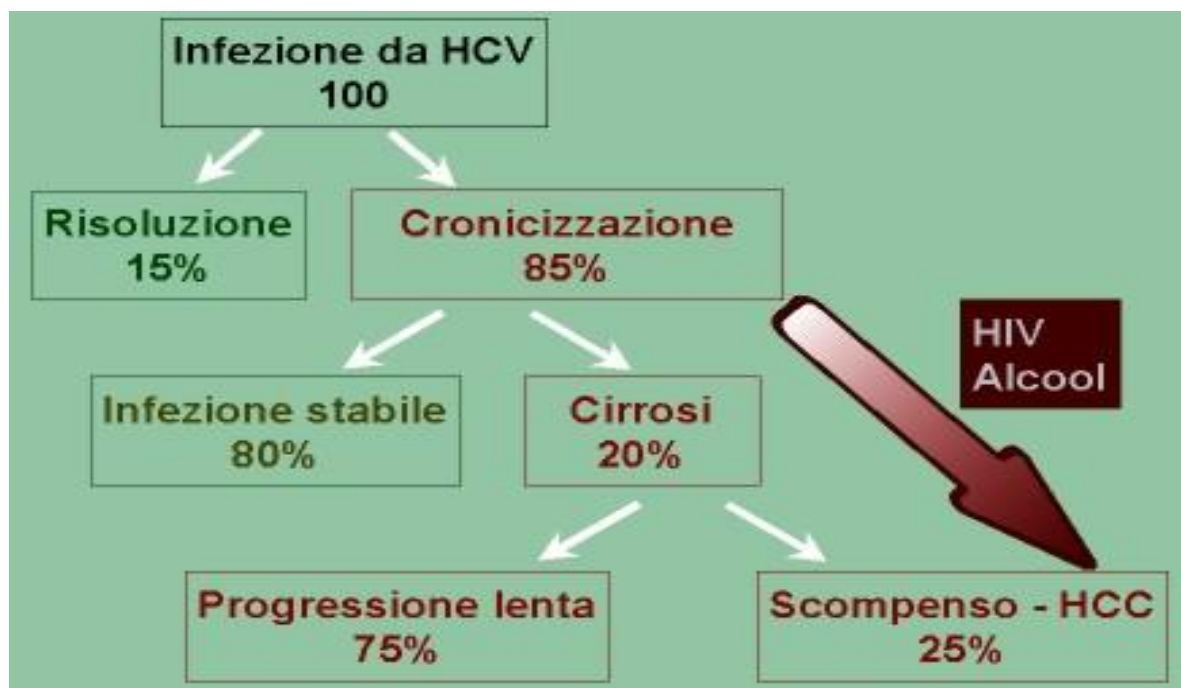
Da un punto di vista clinico, l'HCV rappresenta a livello nazionale la causa più importante di epatopatia, in quanto è riscontrabile nel 62% delle epatiti croniche e nel 73% degli epatocarcinomi. In particolare, sulla base delle evidenze epidemiologiche raccolte, è stato stimato che, a seguito di una ipotetica eradicazione dell'infezione da HCV nel nostro paese, l'incidenza dell'epatocarcinoma potrebbe ridursi del 44%. Occorre comunque sottolineare che in moltissimi casi l'infezione non è accompagnata da chiarissimi segni clinici e/o biochimici di malattia. Una quota consistente di pazienti presenta, infatti livelli di aminotrasferasi (ALT) persistentemente nella norma.

1.1.4. Storia naturale

L'infezione primaria è del tutto asintomatica nel 60-70% dei casi, nel 20-30% dei pazienti in cui risulta clinicamente evidente, causa un quadro di epatite acuta sovrapponibile a quello ascrivibile agli altri virus epatotropi e cronicizza nel 50-85%, in rapporto a variabili come il tipo di inoculo, l'età e lo stato immunitario dell'ospite. Nel 30-40% dei casi l'evoluzione cronica è caratterizzata da persistenza del virus con aminotrasferasi normali, mentre nel 50-70% dei casi si osservano aminotrasferasi elevate o fluttuanti. In una quota variabile di soggetti portatori del virus, l'epatite cronica C può poi evolvere verso la cirrosi epatica e l'epatocarcinoma. [24]

Non sono completamente chiari i meccanismi attraverso i quali si giunge all'eliminazione di HCV o alla sua persistenza nell'organismo: probabilmente esistono una suscettibilità individuale su base genetica e un ruolo della variabilità genomica virale nel determinare l'evasione della risposta immunitari.

Figura 3: storia naturale dell'infezione da HCV



Va precisato però che nei diversi studi di storia naturale, le percentuali di progressione sono spesso molto diverse, probabilmente per l'eterogeneità dei pazienti studiati. Nell'evoluzione della malattia giocano infatti un ruolo fondamentale alcuni fattori legati all'ospite quali sesso, età e sorgente dell'infezione. In particolare, diversi sono i co-fattori che possono modificarne il decorso, la gravità e la progressione a cirrosi. Tra questi, i più noti sono l'età al momento dell'infezione, la via di infezione e la carica virale infettante, le coinfezioni con altri virus epatici o con HIV, le alterazioni dello stato immunitario, i fattori genetici e razziali, e soprattutto la coesistenza di altre cause epatolesive come alcool, farmaci e dismetabolismo, e varie metaboliche, alle quali negli ultimi anni è stata riconosciuta crescente importanza nel processo di aggravamento del decorso della malattia (accumulo di ferro, obesità, diabete di tipo 2, resistenza all'insulina).

Occorre infine ricordare che l'infezione da HCV è in grado di indurre o favorire malattie extraepatiche (che colpiscono cioè altri organi e tessuti oltre al fegato). La più importante per gravità e frequenza è la crioglobulinemia mista. Si tratta di una malattia da immunocomplessi circolanti, che vengono prodotti a seguito della cronica stimolazione dei linfociti B da parte di costituenti virali. Le manifestazioni cliniche della crioglobulinemia si osservano in circa il 5% dei pazienti e consistono per lo più in porpora (lesioni cutanee) e artralgie, che in alcuni casi si accompagnano a danno renale cronico e neuropatia periferica. L'associazione tra infezione da

HCV e linfoma non-Hodgkin a cellule B è stata dimostrata, ma è di raro riscontro sul piano clinico. I pazienti più a rischio di sviluppare un linfoma franco sono comunque quelli già affetti da crioglobulinemia mista.

Solo l'infezione post-trasfusionale, per la quale è possibile definire con precisione il momento del contagio con HCV, ha permesso di stabilire la storia naturale dell'epatite C. Il quadro clinico è a lungo asintomatico e pertanto solo l'accurato follow-up biochimico e sierologico del paziente può consentire di rivelare la malattia. Nonostante la progressione iniziale asintomatica, l'infezione da virus dell'epatite C causa non solo uno spettro di patologie epatiche con diverso andamento e severità, ma anche un numero di manifestazioni extraepatiche principalmente correlate alla stimolazione cronica del sistema immunitario e ad una risposta autoimmunitaria virus indotta.

1.1.4.1. Epatite C acuta

Il periodo di incubazione e la gravità della fase acuta possono dipendere dall'importanza dell'inoculo. Il periodo medio di incubazione è di 7-8 settimane, ma può variare ampiamente (2-26 settimane). Risulta quindi intermedio tra il tempo di incubazione dell'epatite A e dell'epatite B. Sintomi prodromici sono rari. L'epatite acuta è itterica solo in una piccola parte dei casi (20%) e non itterica con pochi o nessun sintomo nella maggior parte delle infezioni (80%). I sintomi sono generalmente aspecifici: malessere, nausea, dolore al quadrante superiore destro del fegato, urine scure e itterizia. La diagnosi clinica di epatite acuta risulta quindi difficile e può essere effettuata solo con la ricerca di marker virali. La forma severa dell'epatite acuta è rara e l'esistenza di epatite C fulminante controversa [25]. Quando è visibile clinicamente, la malattia dura generalmente 2-12 settimane.

Il primo marker dell'infezione sono livelli di HCV-RNA rilevabili nel siero mediante PCR, subito dopo la prima settimana dall'esposizione e il successivo aumento a 10^6 - 10^8 genomi/mL. Gli anticorpi diventano rilevabili in fase acuta nella maggior parte dei casi, ma in alcuni casi la siero conversione è ritardata di alcune settimane. Le alanino aminotrasferasi sieriche (ALT) iniziano ad aumentare poco prima che appaiano i sintomi clinici. Possono essere raggiunti picchi 10 volte più alti della norma, anche se in genere invece si riscontrano aumenti lievi o moderati.

In pazienti che risolvono l'infezione, le ALT ritornano normali e l'HCV-RNA non è più rilevabile a livello plasmatico; gli anticorpi diminuiscono progressivamente anche se

rimangono evidenziabili per molti anni. Non è chiaro se negli epatociti e nelle altre cellule l'infezione venga eradicata o rimanga a livelli molto bassi.

Se l'infezione diventa cronica, le ALT possono o normalizzare o rimanere moderatamente elevate. Normalmente l'HCV-RNA rimane rilevabile, nonostante alcuni casi di negativizzazione.

La completa risoluzione dell'epatite acuta non è evento comune. Sembra che il tasso di risoluzione sia intorno al 15% e il livello di cronicizzazione vari dal 50% al 90%. Gli studi che si basavano solo sulle ALT riportavano bassi livelli di cronicizzazione, quelli più recenti basati sulla PCR, stimano l'85% di cronicizzazione.

Diversi studi hanno però dimostrato l'efficacia dell'interferone in fase acuta nell'aumentare considerevolmente la probabilità di guarigione, con tassi di risposta virologica sostenuta (SVR) fino al 98%.

Nonostante queste evidenze dei criteri univoci circa la terapia ottimale, la sua durata e il momento migliore per iniziartela, non sono ancora stati definiti con precisione. [26]

Alla terapia specifica bisogna senz'altro aggiungere la terapia di supporto, costituita dal riposo a letto, dalla dieta, l'idratazione e la terapia lassativa.

1.1.4.2. Epatite C cronica

L'epatite cronica può essere definita come una malattia necrotico-infiammatoria del fegato caratterizzata dalla persistenza nel tempo di necrosi epatocitaria e di infiammazione, istologicamente dimostrabili.

La diagnosi viene normalmente condotta attraverso parametri biochimici (transaminasi elevate per oltre sei mesi), virologici (presenza di HCV-RNA nel siero) ed istologici.

E' definita dalla persistenza dell'HCV-RNA a livello sierico per una durata superiore ai sei mesi dopo l'infezione acuta. Come si è già detto, la probabilità di cronicizzazione del virus dopo infezione acuta varia dal 70 all'85% dei casi e tale percentuale si modifica in funzione dell'età, del sesso, della razza e dello stato immunitario del paziente.

La giovane età, contrariamente a quanto accade a proposito dell'epatite B, correla con una più bassa probabilità di cronicizzazione. [9] Anche il sesso femminile sembra essere legato ad un minor rischio di epatite cronica, e in particolare questo accade nelle donne giovani.

A proposito invece della razza, la cronicizzazione è più frequente negli africani che nei caucasici o negli ispanici ed è inoltre favorita da uno stato di immunodepressione congenita o acquisita. [9] [27]

Sembra infine che chi sviluppa un'epatite acuta sintomatica sia meno predisposto alla cronicizzazione rispetto a coloro che contraggono l'infezione in maniera asintomatica. Questo può essere parzialmente spiegato interpretando la manifestazione clinica come un evento legato ad una più vigorosa risposta da parte del sistema immunitario. [9] [28]

Esistono due diversi pattern di Epatite C cronica: uno con ALT normali e l'altro con elevate ALT.

ALT normali: circa il 25% (range 10-40%) dei soggetti con Epatite C ha ALT normali anche se l'HCV-RNA è presente nel siero a livelli evidenziabili. Questi pazienti sono per lo più asintomatici e le loro caratteristiche non sono diverse da quelli con ALT elevate. Sono stati denominati carrier sani, anche se non è un termine del tutto corretto perché a volte presentano anormalità istologica alla biopsia epatica. Diversi studi [29] indicano che il 25% di questi soggetti ha una istologia epatica normale, il 54% ha una lieve epatite cronica e il 21% un'epatite moderata. Normalmente la fibrosi è assente o minima e la cirrosi è presente in meno dell'1% di questi pazienti.

ALT elevate: sono inclusi in questo gruppo il 75% dei pazienti con epatite C cronica. La gravità della malattia epatica può variare considerevolmente. A seconda delle lesioni istologiche epatiche, si può distinguere l'epatite cronica lieve e quella moderata-severa. Questa distinzione è importante per la prognosi della malattia e per il trattamento terapeutico. L'epatite cronica lieve viene diagnosticata in seguito ad identificazione di lesioni epatiche minori durante la biopsia epatica; è definita da valori di fibrosi 0-1. Questo gruppo include circa il 50% delle epatiti croniche con ALT elevate.

L'epatite cronica moderata-severa è definita così per la presenza di lesioni necro-infiammatorie e/o fibrosi estesa, all'atto della biopsia epatica. Lo score della fibrosi è in questo caso 3-4. Questi pazienti rappresentano circa il 50% dei soggetti con epatite C cronica ed ALT elevate e sono difficili da distinguere da quelli con epatite cronica lieve.

1.1.4.2.1. Cirrosi ed epatocarcinoma

La cirrosi è la complicazione più seria dell'epatite cronica C. L'infezione di solito progredisce molto lentamente e quindi la cirrosi si sviluppa generalmente in tempi lunghi, 2-3 decenni. Il

20-30% dei soggetti con Epatite C cronica sviluppa cirrosi dopo 10-20 anni. La rapidità della progressione della fibrosi è influenzata dall'età (infezione in tarda età), sesso (maschile), immunodepressione e abuso di alcool (30). Vi sono altri fattori che influenzano la severità della malattia epatica: fattori virologici come il titolo virale e il genotipo non sembrano incidere in modo significativo sulla prognosi dell'infezione (31). Altri studi ipotizzano invece il ruolo della variabilità genetica di HCV nella progressione dell'infezione [32] anche se l'associazione non è ben definita.

In molti casi la cirrosi HCV-correlata rimane silente e i sintomi clinici della malattia appaiono solo durante lo stadio terminale e includono un notevole affaticamento, debolezza muscolare, ritenzione di liquidi, bruciori e prurito. Spesso le cirrosi asintomatiche vengono scoperte solo alla biopsia epatica. In altri casi la cirrosi viene diagnosticata in conseguenza a complicazioni (asciti e itterizia) e in molti casi la diagnosi viene fatta allo stadio ultimo di carcinoma epatico. Gli esami clinici e biochimici possono avere valore predittivo di cirrosi, ma non sono completamente attendibili. Anche in questo caso la diagnosi più attendibile di cirrosi viene fatta con la biopsia epatica, anche se a volte la cirrosi non viene evidenziata, magari per l'insufficienza del campione di tessuto prelevato.

Pazienti con cirrosi da HCV hanno un tasso di mortalità dovuta a ipertensione portale, fallimento epatico o epatocarcinoma del 2-5% l'anno. La cirrosi in fase terminale è una delle maggiori indicazioni per il trapianto di fegato: il 30% dei trapianti è dovuto a tale causa. E' frequente dopo l'intervento che l'infezione ricorra anche se nella maggior parte dei casi è più lieve.

Il carcinoma epatico si manifesta generalmente in soggetti con cirrosi. Tra questi l'incidenza di epatocarcinoma è elevata, pari al 3-10%. Tale incidenza è 3-5% nei paesi occidentali e più alta invece in Asia. Normalmente il carcinoma epatico si presenta nelle cirrosi compensate ed è clinicamente silente per lungo tempo. Le terapie non sono efficaci e il trapianto d'organo può essere effettuato solo in un numero piccolo di pazienti.

1.1.4.3. Aminotrasferasi e infezione da virus C

Un punto rilevante da considerare nella storia naturale dell'infezione da HCV riguarda i livelli di aminotrasferasi, in particolare dell'ALT o GPT, l'enzima che valuta lo stato di sofferenza degli epatociti. Secondo studi recenti, circa la metà dei soggetti con infezione cronica da HCV presenta livelli di ALT che si posizionano ripetutamente nel cosiddetto intervallo di normalità. Questi soggetti sono stati per lungo tempo considerati come "sani" o "asintomatici". Tuttavia,

anche se i tempi di progressione della fibrosi sono circa raddoppiati rispetto ai pazienti con una franca alterazione delle aminotrasferasi, una malattia istologicamente significativa è inoltre presente in circa il 20-30% dei pazienti con livelli normali da ALT. Questi pazienti, inoltre, se sottoposti a trattamento antivirale, mostrano una apprezzabile riduzione dei livelli di ALT rispetto ai valori basali.

E' importante puntualizzare che la discrepanza tra dati clinici e dati biochimici è in parte dovuta ad una impropria interpretazione del dato di laboratorio. Infatti, i livelli di aminotrasferasi sono un indicatore attendibile dei livelli di necroinfiammazione ma non di fibrosi; quest'ultima viene attualmente considerata come l'aspetto più rilevante del danno epatico, in quanto guida la decisione terapeutica nei pazienti con epatite cronica.

1.1.5. Terapia

Nella malattia cronica da HCV l'obiettivo della terapia è l'eradicazione dell'infezione con lo scopo di evitare la progressione dell'epatite cronica in cirrosi e prevenire le complicanze della cirrosi epatica.

La terapia dell'epatite C ha subito un'evoluzione significativa negli ultimi 15 anni. La monoterapia con Interferone alfa è stata prima sostituita dalla più efficace terapia di combinazione con Interferone alfa e Ribavirina e più recentemente dai nuovi tipi di Interferone alfa pegilati, a lunga emivita (PEG-IFN), in combinazione con la Ribavirina. I risultati di numerosi studi dimostrano in modo convincente la maggiore efficacia dei PEG-IFN rispetto agli interferoni non pegilati nel trattamento dell'epatite cronica e della cirrosi compensata da HCV. La combinazione di PEG-IFN (PEG-a2b o PEG-a2a) e Ribavirina è stata pertanto adottata come standard di terapia per l'epatite C.

1.1.5.1. Obiettivi della terapia

Gli obiettivi del trattamento dell'epatite da HCV sono modulati in relazione al quadro clinico e possono essere così riassunti:

Epatite cronica: eliminare il virus per prevenire la progressione della fibrosi epatica, l'evoluzione in cirrosi e le sue complicanze e, a lungo termine, migliorare la qualità della vita e la sopravvivenza;

Cirrosi compensata: eliminare il virus per prevenire le complicanze della malattia, potenzialmente ridurre l'evoluzione verso l'epatocarcinoma e migliorare, a breve termine, la qualità di vita e la sopravvivenza;

Epatite acuta: eliminare il virus per evitare la cronicizzazione dell'infezione.

1.1.5.2. Farmaci e schemi di terapia nella pratica clinica:

I farmaci oggi approvati per la terapia cronica da HCV comprendono vari tipi di Interferone alfa, non pegilati (Interferone a2a ed a2b ricombinanti, utilizzabili in combinazione con Ribavirina o in monoterapia; Interferone n-1 linfoblastoide ed interferone alfa n-1 ricombinante, utilizzabili in monoterapia; Interferone alfa naturale alfa-n3, utilizzabile in combinazione con Ribavirina o in monoterapia solo in soggetti che abbiano presentato fenomeni di documentata intolleranza ad altri interferoni), due interferoni pegilati (PEG-IFN a2b e PEG-INF a2a utilizzabili in combinazione con Ribavirina o in monoterapia) e la Ribavirina, utilizzabile solo in terapia di combinazione.

Gli Interferoni alfa sono una famiglia di citochine che comprende 20-25 specie diverse per sequenza aminoacidica e glicosidazione. Gli IFN alfa influenzano la crescita e la differenziazione cellulare, modulano la risposta immune e inibiscono direttamente la replicazione di vari virus, compreso HCV.

Considerando la breve emivita degli IFN alfa dopo somministrazione parenterale e la necessità di mantenere costantemente elevata l'attività antiretrovirale a livello cellulare per meglio contrastare la rapida cinetica della replicazione virale, sono state sviluppate nuove formulazioni di IFN alfa, a più lunga emivita.

Queste formulazioni si basano sulla coniugazione dell'IFN con glicole proteico (PEG) mediante legame covalente, ottenendo composti che presentano più lento assorbimento ma soprattutto minor degradazione enzimatica e rallentata clearance. Sono stati sino ad oggi sviluppati due diversi tipi di PEG-IFN, che differiscono per il sottotipo di IFN utilizzato, ma soprattutto per caratteristiche di pegilazione: il PEG-IFN a2b è IFN a2b legato ad una molecola lineare di PEG di 12kD, mentre il PEG-IFN a2a è IFN a2a legato ad una molecola ramificata di Peg di 40kD.

La Ribavirina è un analogo nucleotidico usato nell'uomo da oltre 20 anni. La Ribavirina ha scarsa attività antiretrovirale su HCV, quando utilizzata in monoterapia. In combinazione con IFN alfa determina un incremento significativo della risposta a lungo termine rispetto alla monoterapia con solo Interferone, attraverso meccanismi di sinergismo non ancora del tutto

definiti ma che potrebbero consistere prevalentemente in effetti di immunomodulazione, piuttosto che antivirali diretti. La Ribavirina va impiegata nell'epatite C solo in combinazione con IFN alfa. La monoterapia con solo Ribavirina non è giustificata dai dati della letteratura. La terapia più efficace oggi disponibile è senz'altro la combinazione con Peg-Interferon e Ribavirina. Questo trattamento si è dimostrato superiore alla monoterapia con solo Interferone, indipendentemente dal tipo di IFN impiegato, da dosaggi e frequenza di somministrazione e durata del trattamento. La terapia di combinazione è più efficace della monoterapia in tutti i diversi sottogruppi virologici e clinici dell'epatite C e dovrebbe pertanto essere sempre utilizzata in assenza di controindicazioni o di documentata intolleranza grave alla Ribavirina. Infine, è bene sottolineare che non esistono ad oggi dati conclusivi su quale interferone utilizzare nel singolo paziente.

1.1.5.3. Dosi e durata della terapia di combinazione:

Sulla base dei risultati dei trial clinici più significativi la terapia di combinazione va attuata utilizzando schemi differenziati per i pazienti con genotipo 1 o 4 rispetto a soggetti con genotipo 2 o 3. Se si impiega PEG-IFN, il dosaggio, in unica somministrazione settimanale è identico per i diversi genotipi con dose calcolata sul peso corporeo per PEG-IFN a2b (1.5mg/Kg/settimana) e fissa per PEG-IFN a2a (180 mg/settimana). [33] Questa dose iniziale può essere ridotta se insorgono effetti collaterali o eventi avversi che lo richiedano. Va considerato il fatto che una riduzione del dosaggio iniziale >20-25% può determinare una significativa perdita di efficacia.

La dose iniziale di Ribavirina consigliata è di 1000-1200 mg al dì per i pazienti con genotipo 1 o 4 e di 800-1000 mg per quelli con genotipo 2 o 3. [33] La durata della terapia è di 12 mesi per l'infezione da genotipo 1 e 4 e di 6 mesi per l'infezione da genotipo 2 e 3.

1.1.5.4. Monitoraggio e valutazione della risposta alla terapia:

La terapia combinata non è sempre efficace nell'indurre l'eradicazione dell'infezione. Diverse variabili legate al virus e all'ospite influiscono sulla probabilità di successo.

La risposta alla terapia deve essere valutata con i test virologici disponibili. L'uso dei test qualitativi per HCV-RNA nel monitoraggio della risposta alla terapia e nella valutazione dell'esito a lungo termine è ormai standardizzato. I test attualmente disponibili hanno

sensibilità fino a 10-50 UI/ml e rappresentano il parametro di riferimento per definire la risposta virologica durante, a fine e dopo la terapia. Il test qualitativo per HCV-RNA va eseguito al terzo mese di terapia con la combinazione Peg-IFN e Ribavirina, per definire la sensibilità della terapia. I pazienti che restano positivi per HCV-RNA dovrebbero esser considerati non responsivi allo schema terapeutico utilizzato.

In tutti i pazienti responsivi (HCV-RNA negativi) al terzo mese, il test qualitativo dovrebbe esser ripetuto a fine terapia per stabilire la ETR (“end-of-therapy-response”). Questa valutazione permette, infatti, in casi di positività dopo terapia, di distinguere i “relapsers” (pazienti negativi a fine terapia con positivizzazione dopo sospensione) dai casi che hanno sviluppato resistenza già in terapia (ripositivizzati già durante la terapia dopo una fase iniziale di negatività). La distinzione di questi diversi profili di risposta può risultare utile al momento di stabilire se e come ritrattare il paziente. Il test qualitativo per HCV-RNA deve essere infine ripetuto dopo sei mesi dalla sospensione della terapia per definire la risposta virologica sostenuta. Il paziente potrà esser considerato guarito dall’epatite al 95-98% se il test per HCV-RNA risulta negativo a sei mesi dalla sospensione della terapia.

Vi è oggi particolare interesse verso quei pazienti che mostrano una risposta virologica rapida, definibile come la negativizzazione di HCV RNA alla quarta settimana di trattamento, in cui potrebbe essere sufficiente un trattamento breve (da 12 a 16 settimane).

Le possibilità di successo della terapia variano in misura piuttosto considerevole a seconda del genotipo virale infettante, della carica virale infettante, della carica virale e del grado di progressione della malattia di fegato. Gli studi clinici sin qui eseguiti indicano che nei pazienti con genotipo 2 la percentuale di risposta virologica sostenuta è particolarmente elevata (fino all’80%). Essa è invece un po’ inferiore nei pazienti con genotipo 3 (tra il 50 e il 60%), e sostanzialmente ridotta in quelli con genotipo 1 (tra il 30 e il 50%). Infine, è stato documentato che solo il 20-30% dei pazienti che hanno già sviluppato una cirrosi risponde al trattamento antivirale.

Quindi le risposte alla terapia combinata possono essere distinte in: Risposta Virologica Sostenuta, recidiva dopo iniziale negativizzazione (“Relapse”) e non risposta.

La Risposta Virologica Sostenuta è definita dal mancato riscontro mediante PCR di RNA virale nel siero dopo 24 settimane dalla fine della terapia. I pazienti con HCV-RNA negativo al termine del trattamento, ma che si ripositivizza nelle 24 settimane successive sono invece

classificati come “Relapsers”. Tra i “Non responders” infine annoveriamo quei pazienti che non vanno mai incontro alla negativizzazione della carica virale. [34]

I fattori in grado di influenzare l'esito del trattamento sono numerosi:

-Genotipo virale: rappresenta sicuramente il principale fattore in grado di influenzare il successo terapeutico. Come precedentemente menzionato i tassi di Risposta Virologica variano dal 76-82% dopo 24 settimane nel caso dei genotipi 2 e 3 al 41-52% dopo 48 settimane nel caso del genotipo 1. [33] [34] [35] [36] [37]

-Compliance del paziente: di fondamentale importanza è l'aderenza al regime terapeutico. [33] Questa viene talvolta a mancare per lo più a causa dell'insorgenza di effetti collaterali ai farmaci. [37]

-Fattori individuali specifici: rientrano in questa categoria una serie di fattori eterogenei, la cui valutazione, insieme a tutti gli altri, prima di iniziare il trattamento farmacologico può aiutare il medico a stimare più correttamente le aspettative che il singolo paziente può nutrire nei confronti della cura che sta per intraprendere. Sostanzialmente si tratta di fattori che aiutano nell'analisi rischi-benefici relativa alla prescrizione della terapia farmacologica. Tra questi in particolare sono positivamente correlati alla SVR bassi livelli di carica virale (<600.000-800.000 U/mL) [33] [34] [37] [38], l'assenza di un quadro di steatosi, fibrosi e ancor più di cirrosi epatica [33] [34] [37], il sesso femminile [33] [34] [37], la giovane età [33] [34] [37], la razza caucasica o asiatica piuttosto che africana [33] [34] [37] [38]. Sono invece legati a una maggior probabilità di fallimento terapeutico l'obesità [33] [37], la steatosi, fibrosi o cirrosi epatica [33] [34] [37], l'intolleranza al glucosio e il diabete 2 (SVR=44% in pazienti con IGT e DM2 vs. 58,8% in pazienti con metabolismo glucidico nella norma) [37] [39], l'insufficienza renale [37] [40], la coinfezione con HIV (forse in funzione di livelli più elevati di carica virale), [37] [41] [42] l'abuso alcolico [33] e la razza africana (studi dimostrano tassi di SVR che vanno dal 19% al 28% tra pazienti Afro Americani con genotipo 1 rispetto al 52% in pazienti bianchi con lo stesso genotipo. [37] [43] [44] In pazienti con genotipi 2 e 3 la probabilità di SVR sembra del 57% negli Afro-Americanici contro l'82% nei bianchi). [37] [45]

-Cinetica virale durante la terapia: dal momento che le manifestazioni cliniche dell'infezione da HCV si manifestano molto lentamente nel tempo, ciò che si utilizza per monitorare la risposta alla terapia è la cinetica virale, in particolare tramite la rilevazione dell'HCV-RNA a livello sierico a 4, 12, 24, eventualmente 48 settimane e infine sei mesi dopo il termine del trattamento.

Dati recenti suggeriscono come la cinetica virale abbia un ruolo assai importante nel predire la futura risposta alla terapia, visto che il tasso di SVR sembra variare in maniera inversamente proporzionale alla velocità di clearance virale. In particolare il dosaggio della carica virale a 4 e 12 settimane ci consente di distinguere due tipologie particolari di risposta al trattamento: la Risposta Virologica Rapida (Rapid Virological Response - RVR) e la Risposta Virologica Precoce (Early Virological Response - EVR).

L'EVR è definito da una riduzione dell'HCV-RNA ≥ 2 log rilevabile alla dodicesima settimana di terapia. L'assenza di EVR è altamente predittiva di fallimento terapeutico. [37] Vari studi dimostrano come il 97-100% dei pazienti che non raggiungono questo risultato terapeutico non raggiungano neanche la Risposta Virologica Sostenuta dopo trattamento standard. [31] Queste evidenze circa l'elevato valore predittivo negativo dell'EVR hanno portato alla cosiddetta "Regola delle 12 settimane": in assenza di EVR la terapia viene interrotta in quanto non ci sono evidenze di un possibile futuro successo. [34]

D'altra parte la presenza dell'EVR è meno accurata nel predire la successiva Risposta Virologica Sostenuta rispetto a quanto la sua assenza sia predittiva di fallimento. [37] [46] Un'EVR completa (HCV-RNA indosabile a 12 settimane) ha però un valore predittivo maggiore di un'EVR incompleta (riduzione ≥ 2 log ma con RNA ancora disabile), con un tasso di SVR dell'83% nel primo caso, rispetto al 21% nel secondo caso. [37] [46] [47]

Si parla invece di RVR quando l'HCV-RNA risulta indosabile già dopo sole 4 settimane di terapia. Diversi studi hanno dimostrato che la presenza di RVR in pazienti con genotipo 1 è associata ad un tasso di RVS pari all'89% dopo sole 24 settimane di terapia. [33] [37] [48] La scelta di accorciare la durata della terapia a 24 settimane in questa classe di pazienti deve però essere ben ponderata e considerata solo esclusivamente in presenza di bassi livelli di carica virale (<800.000 UI/mL nel caso di utilizzo del PEG-IFN 2 a e <600.000 nel caso di utilizzo del PEG-IFN 2 b) e in assenza di comorbidità come infezione da HIV o cirrosi. La possibilità di accorciare la durata della terapia secondo tale schema è un'alternativa attualmente approvata nell'Unione Europea [33]. Per quanto riguarda invece i genotipi 2 e 3, diversi studi sono stati condotti con lo scopo di valutare se anche qui esiste correlazione tra la presenza di

RVR e successiva RVS; i risultati ottenuti sono stati però discordanti, [33] pertanto non esistono attualmente raccomandazioni circa la possibilità di accorciare la durata del trattamento in questo gruppo di pazienti.

Un'ultima considerazione può essere fatta circa l'utilità di prolungare la terapia oltre la durata standard in pazienti senza RVR: sembra che tale prolungamento, nello specifico fino a 72 settimane, possa essere utile ad aumentare il tasso di RVS in pazienti con genotipo 1. [33] [49] [50]

1.2. COINFEZIONE HIV-HCV

A causa della comune via di trasmissione parenterale, la prevalenza globale di infezione da HCV tra i soggetti HIV positivi, è approssimativamente del 30-50%, con punte massime tra i tossicodipendenti (90%) e i pazienti emofiliaci (100%). [51]

Vi sono molte evidenze che le microtrasfusioni che avvengono durante l'iniezione con una siringa contaminata possano trasmettere patogeni per via parenterale. HCV e HIV-1 sono i due patogeni più comunemente trasmessi tra i tossicodipendenti. [52] Ed è anche probabile, benché meno evidente, che il comune uso di altri strumenti possa contribuire a diffondere tali infezioni.

Fino a non molto tempo fa, la maggior parte dei soggetti HIV positivi moriva prima ancora della manifestazione dei sintomi legati ad HCV, la cui comparsa può anche verificarsi 20-30 anni dopo che si è contratta l'infezione. Attualmente, l'introduzione della HAART (highly active antiretroviral therapy) per la cura dell'infezione da HIV-1 ha drasticamente diminuito l'incidenza di morbidità e mortalità in molti soggetti HIV positivi. Come risultato dell'aumentata aspettativa di sopravvivenza, HCV risulta essere un patogeno di notevole peso nella gestione clinica dei soggetti coinfecti, e l'infezione cronica da HCV è diventata la principale causa di morbidità e mortalità tra i soggetti HIV positivi.

Sono stati documentati i cambiamenti avvenuti nel pattern di mortalità dalla fine degli anni '90, quando è avvenuta l'introduzione della HAART, fino alla fine del secolo. Precedentemente solo il 50% delle cause di mortalità era da attribuirsi a danno epatico. Simili testimonianze giungevano anche da paesi come l'Italia, la Francia e l'Inghilterra [53].

Attualmente più del 60% dei soggetti HIV positivi si sottopongono a trapianto di fegato a causa dell'infezione da HCV. Le implicazioni cliniche della coinfezione sono perciò diventate il fulcro di numerose indagini.

La maggior parte degli studi non ha evidenziato un'influenza significativa di HCV sulla progressione dell'infezione di HIV-1 in termini di numero di CD4 o di stadi di azione clinica. Al contrario, l'infezione da HIV modifica notevolmente il decorso dell'infezione da HCV.

È stato dimostrato che la coinfezione aumenta la severità del danno epatico: in soggetti infetti da HCV cronico [54], peggiora la fibrosi epatica [55] e influisce sulla risposta al trattamento anti-HCV.

Molti dei dati disponibili in letteratura sull'aumento del rischio di mortalità dovuta ad un avanzamento del danno epatico riguardano popolazioni di emofiliaci, tra i quali, come già ribadito, l'incidenza di coinfezione è molto alta.

La mortalità dovuta a danno epatico si verifica in pazienti HCV positivi, anche se altri cofattori come l'abuso di alcool, l'infezione cronica da HBV e la somministrazione di farmaci epatotossici possono contribuire alla progressione e al peggioramento della malattia epatica cronica.

Il decorso accelerato dell'infezione da HCV in pazienti HIV positivi emofiliaci e tossicodipendenti giustifica la raccomandazione da parte del servizio di sanità pubblica degli Stati Uniti che tutti i pazienti HIV positivi si sottopongano a test sierologico per HCV. Inoltre, i soggetti sieronegativi ma considerati a rischio per HCV, dovrebbero comunque sottoporsi alla ricerca dell'RNA virale di HCV. Infatti, in caso di coinfezione, si osservano variazioni di tipo sierologico con una diminuzione della reattività verso antigeni di HCV: risultati indeterminati al RIBA aumentano dal 10% al 25% e si ha circa il 20% di sieroconversioni all'ELISA (negativizzazione) in pazienti precedentemente anti-HCV positivi. In questi casi è necessario associare la PCR ai test sierologici, se la ricerca di HCV-RNA risultasse positiva deve essere effettuata una biopsia epatica per valutare l'attività necro infiammatoria e la fibrosi del fegato, al fine di decidere l'eventuale regime terapeutico. Quindi, la perdita di anticorpi per HCV è stata ampiamente descritta nei soggetti HIV positivi, benché falsi negativi non siano stati riscontrati in un recente studio che si è avvalso dell'utilizzo di kit ELISA di terza generazione.

I tentativi di trattare soggetti HIV-1/HCV coinfeziti sono stati resi difficili dalle limitazioni dei trials clinici e degli scarsi risultati ottenuti in alcune coorti di pazienti. Le ragioni sono complesse e numerose. La consapevolezza che HCV sia una patologia importante ma trattabile in soggetti HIV positivi è abbastanza recente.

1.2.1. Epidemiologia

La coinfezione da parte di HIV e di HCV è un evento frequente, dovuto in particolar modo alla comune modalità di trasmissione di questi due virus.

Si stima che dal 15 al 30 % dei pazienti HIV positivi, siano anche HCV positivi. A proposito di tale valore percentuale esiste peraltro un notevole range di variabilità a seconda delle caratteristiche epidemiologiche della sottopopolazione di pazienti HIV positivi che si considerano: tra i tossicodipendenti e i politrasfusi prima del '91 si registrano i più alti tassi di coinfezione, pari al 91% e 71% rispettivamente, mentre tra gli individui con fattori di rischio per lo più sessuali le percentuali di coinfezioni scendono al 5-10% circa. [56] [57] Questi dati sono validi per quanto riguarda Europa, USA e Australia. Rimane invece incerta la frequenza di coinfezioni nell'Africa sub-sahariana, dove si concentrano i due terzi degli individui HIV positivi nel mondo. Complessivamente si contano a livello mondiale circa 10 milioni di individui con coinfezione. [58]

L'introduzione della HAART nel 1996 ha portato un importante declino della mortalità per infezioni opportunistiche tra i pazienti con infezione da HIV; tale notevole successo ha però indirettamente aumentato il ruolo delle epatopatie per quanto riguarda morbidità e mortalità del paziente sieropositivo per HIV. [56] [59]

Lo studio e la gestione del paziente con coinfezione HIV-HCV rappresentano dunque attualmente un obiettivo fondamentale dell'infettivologia e dell'epatologia.[56]

La distribuzione genotipica nei pazienti coinfezioni riflette la via di trasmissione. Il genotipo 1b di HCV comprende circa il 2/3 delle infezioni da virus delle epatite C in soggetti HIV positivi ed è predominante negli emofiliaci, a differenza dei genotipi 1 e 3 che sono più frequenti tra i tossicodipendenti [60].

La trasmissione verticale di HCV, da madri monoinfette, si stima essere approssimativamente intorno al 4-8%. Sembra che la coinfezione, soprattutto in presenza di alta carica virale di HCV, aumenta tale rischio. La terapia antiretrovirale e il parto cesareo abbassano la trasmissione perinatale fino all'1%. Una recente ricerca suggerisce che il rischio di infezione da HIV-1 attraverso la via sessuale non venga aumentato dalla coinfezione, ma il ruolo di HCV sul tasso di trasmissione di HIV-1 resta ancora sconosciuto.

1.2.2. Storia naturale della coinfezione

Sia HIV, Retrovirus, che HCV, Flavivirus, sono virus a RNA a singola elica che causano un'infezione cronica. Entrambi sono inoltre in grado di evadere la risposta immune dell'ospite, attraverso l'elevato tasso di mutazioni spontanee favorito in parte dalla loro rapida replicazione e in parte dalla mancata capacità di riparare gli errori di incorporazione

nucleotidica. La produzione giornaliera di virioni è stimata pari a 10^{10} per HIV e pari a 10^{12} per HCV. [61] Entrambi esistono inoltre nel singolo ospite sottoforma di “quasispecie” che possono diffondersi in differenti compartimenti dell’organismo. [61] [62]

La compresenza di HIV e HCV può complicare la storia naturale delle singole infezioni rispettivamente e può altresì influenzare negativamente l’efficacia delle due specifiche terapie. [61] [63]

Dopo un’epatite C acuta, la probabilità di cronicizzazione sale dal 70-85% nei pazienti monoinfetti, al 90-95% negli individui HIV positivi, con un rischio particolarmente elevato per gli individui con immunodepressione grave. [64]

Pazienti con coinfezione presentano in genere valori più elevati di HCV-RNA nel sangue [61][64] [65] e in alcuni studi sembra che questi salgano al decrescere della conta di linfociti CD4+. [61] [65] Cariche virali più elevate possono a loro volta associarsi ad una maggiore probabilità di trasmissione del virus da parte dell’ospite. [64] Per quanto riguarda la trasmissione materno-fetale di HCV, cariche virali significativamente maggiori si riscontrano in donne con coinfezione e il rischio di trasmissione verticale di HCV da parte di queste ultime è aumentato di tre-cinque volte rispetto a quello che si registra in gravide monoinfette. [64] [66]

Sembra che HIV possa facilitare la replicazione di HCV tramite la depressione del sistema immunitario. [61] Esistono sicuramente altri fattori coinvolti in tale meccanismo patogenetico dal momento che una terapia antiretrovirale efficace non sembra essere associata ad una riduzione dei livelli di HCV-RNA. [61]

Rispetto ai pazienti non HIV positivi, i coinfetti presentano anche una più rapida progressione verso la fibrosi e quindi verso la cirrosi [61], in particolare se hanno basse conte di linfociti CD4 [64] [67] [68] [69] o se hanno una storia di potus. [64] Più elevato nei coinfetti è anche il rischio di sviluppare un epatocarcinoma [61] che si presenta in forma infiltrativa e multifocale più spesso di quanto non accada nei monoinfetti. [70][71]

Si capisce quindi come sia significativo nei pazienti con coinfezione il rischio di patologia epatica terminale.

Per quanto concerne gli effetti della HAART nei pazienti HIV-HCV positivi è necessario fare due considerazioni fondamentali. Da un lato esiste in questi pazienti un maggiore rischio di sviluppare epatotossicità farmaco correlata, in particolare se il loro schema terapeutico comprende la nevirapina o il ritonavir. [61] [64] Dall’altro esistono evidenti conferme

riguardanti l'utilità della terapia antiretrovirale nel ridurre l'evoluzione verso la fibrosi e la cirrosi HCV correlate e quindi anche la mortalità legata a complicanze epatiche. [64] [72] [73]

I meccanismi attraverso i quali HCV influenza l'andamento dell'infezione da HIV, invece, non sono perfettamente chiariti: alcuni ipotizzano che l'infezione da HIV possa essere accelerata dall'attivazione del sistema immunitario da parte di HCV. [61]

La maggior parte degli studi non hanno comunque trovato alcuna associazione tra la coinfezione e la morbilità e mortalità legate all'infezione da HIV. [64] Non sembra che nei coinfezti esista un aumentato rischio di AIDS, né un più rapido declino dei CD4. [64] [74] Anche la risposta immunologica e virologica alla HAART non sembrano essere influenzate dalla compresenza di HCV. [61]

Una percentuale minore di studi hanno invece evidenziato una correlazione tra coinfezione e progressione verso l'AIDS oltre che mortalità AIDS correlata. [64] [75] L'interpretazione di tali risultati deve però essere fatta con grande cautela; bisogna infatti ricordare come esistano sostanziali differenze da un punto di vista epidemiologico tra pazienti coinfezti e monoinfezti, prima tra tutte la tossicodipendenza attiva, che potrebbero aver avuto un ruolo sostanziale nell'aderenza alla terapia e nella progressione verso l'AIDS. [64]

1.2.3. Trattamento dell'infezione da HCV in pazienti coinfezti

L'obiettivo della terapia per l'epatite cronica C è l'eradicazione virale o Risposta Virologica Sostenuta. Questo risultato è associato a miglioramento istologico e a significativa diminuzione del rischio di progressione verso la cirrosi e l'epatocarcinoma.

1.2.3.1. Screening:

Dal momento che la prevalenza della coinfezione è elevata, tutti i pazienti HIV positivi andrebbero valutati con uno screening per HCV tramite le metodiche immunoenzimatiche di terza generazione. In presenza di specifici fattori di rischio, anche i pazienti HCV positivi dovrebbero essere valutati con uno screening per HIV.

In caso di sieropositività per HCV, l'esistenza dell'infezione attiva andrà confermata tramite il dosaggio della carica virale. Inoltre, i pazienti sieropositivi per HIV con basse conte di linfociti CD4 possono non avere anticorpi rilevabili contro HCV, così come può accadere nelle prime fasi di un'epatite C acuta in individui immunocompetenti. In accordo con tale

considerazione il dosaggio dell'HCV-RNA andrà richiesto in un paziente HIV positivo con consistente immunodepressione, se dopo aver ottenuto un risultato negativo del titolo anticorpale, rimanesse elevato il sospetto clinico di infezione da virus C. [61]

Relativamente ai pazienti con coinfezione è interessante ricordare come un'analisi retrospettiva di 832 pazienti dello studio APRICOT (the AIDS Pegasys Ribavirin International Coinfection Trial) abbia identificato la conta piastrinica, l'età e i livelli di transaminasi come variabili strettamente correlate allo stadio della fibrosi epatica. E' stata messa a punto un'equazione comprendente tali variabili per creare un indice (FIB-4) che è stato in grado di classificare correttamente l'87% dei pazienti dello studio relativamente al grado di fibrosi. [61] [76]

1.2.3.2. Identificazione dei candidati alla terapia:

I candidati alla terapia anti HCV tra i coinfetti devono essere selezionati tra coloro per i quali i potenziali benefici del trattamento superino i corrispondenti rischi. [61] A tale proposito è fondamentale valutare lo stadio dell'infezione da HIV, la quale deve essere stabile, indipendentemente dal fatto che il paziente sia o meno in TARV. Per pazienti con elevate conte di linfociti CD4 ($>350/\mu\text{L}$), per i quali la terapia antiretrovirale non risulta essere indicata nell'immediato, il trattamento anti HCV va assolutamente considerato. Coloro invece che presentino $\text{CD4} < 200/\mu\text{L}$ e infezione da HIV non trattata, devono inizialmente essere stabilizzati con l'introduzione della HAART prima che possa essere preso in considerazione di iniziare l'associazione Interferone-Ribavirina [61] [77], in quanto né l'efficacia né la sicurezza di tale terapia sono state provate in pazienti gravemente immunodepressi. [77] [78] Si ritiene infatti che sia fondamentale, per ottenere dei risultati positivi con la terapia combinata, un buon funzionamento del sistema immunitario.

1.2.3.3. IFN pegilato e Ribavirina:

Le linee guida per il trattamento di HCV nei pazienti coinfetti indicano l'utilizzo di IFN Pegilato e Ribavirina. L'efficacia di tale associazione è stata provata da quattro grandi studi randomizzati i cui risultati sono stati pubblicati nel 2004. Questi studi hanno dimostrato la notevole superiorità di Peg-IFN e Ribavirina rispetto a IFN standard e Ribavirina nell'indurre SVR in individui con coinfezione da HIV. Ciò nonostante la percentuale di risposte virologiche sostenute dopo terapia combinata si è rivelata inferiore rispetto a quella ottenuta

con la medesima terapia in pazienti monoinfetti, in particolare per quanto riguarda i genotipi 1 e 4. [78]

Sia lo studio APRICOT (the AIDS Pegasys Ribavirin International Coinfection Trial) che lo studio RIBAVIC hanno confrontato l'IFN standard alfa-2a e alfa-2b con le corrispondenti formulazioni pegilate, per una durata totale della terapia pari a 48 settimane, in pazienti con differenti genotipi virali. La dose di Ribavirina era di 800 mg/die, dose inferiore rispetto a quella utilizzata nei monoinfetti, scelta sulla base della possibilità di interazione con gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa, oltre che della possibile anemizzazione collaterale. [61] Entrambi gli studi hanno dimostrato la superiorità dell'interferone pegilato: lo studio APRICOT ha riportato percentuali di SVR pari al 40% nel gruppo trattato con Peg-IFN rispetto al 12% nel gruppo trattato con l'utilizzo della formulazione standard (genotipo 1: 29% vs 7%, genotipo 2-3: 72% vs 20%, rispettivamente). Nei pazienti cirrotici, gruppo più complesso da trattare, il tasso di SVR è stato del 30% circa nei trattati con peg-IFN. Lo studio RIBAVIC ha ottenuto nel primo gruppo SVR pari al 27% rispetto al 20% nel secondo gruppo (genotipo 1-4: 17% vs 6%, genotipo 2-3: 44% vs 43%). Diversi fattori possono essere stati coinvolti nell'influenzare le minori percentuali di successo ottenute dallo studio RIBAVIC, tra cui un numero maggiore di pazienti con fibrosi e cirrosi epatica arruolati, oltre che una minore aderenza alla terapia degli stessi. [61]

Per quanto riguarda le linee guida circa la durata del trattamento anti HCV nei coinfetti, attualmente l'indicazione è di 48 settimane per il genotipo 1 e di 24 settimane per i genotipi 2 e 3. Studi preliminari suggeriscono d'altra parte che tutti i pazienti dovrebbero essere trattati per 48 settimane in quanto il trattamento per 24 settimane in coinfetti con genotipi 2 e 3 è associato ad elevate percentuali di recidiva. [61] [79] Altri studi suggeriscono invece come la durata della terapia dovrebbe più che altro dipendere dalla risposta individuale del paziente. [61]

Per quanto riguarda le dosi della Ribavirina queste seguono le medesime indicazioni valide per i pazienti monoinfetti (dose fissa di 800 mg/die per i genotipi 2 e 3 e dose variabile tra i 1000 e i 1200 mg/die in funzione del peso corporeo, per i genotipi 1 e 4) anche se nei coinfetti bisogna operare un più stretto monitoraggio delle reazioni avverse e valutare eventualmente una riduzione della dose del farmaco, nonostante esistano evidenze che tale riduzione della dose possa compromettere il raggiungimento della risposta virologica. [70]

1.2.3.4. Predittori di SVR

Dagli studi menzionati sono emersi diversi fattori legati alla risposta virologica sostenuta alla terapia anti HCV. Riassumendo questi possono essere sintetizzati in: bassi livelli di HCV-RNA pre-terapia [78], trattamento con IFN pegilato e non con IFN standard [78], assenza di abuso di droghe per via endovenosa [78], livelli di ALT maggiori di tre volte il limite superiore di riferimento e dosi giornaliere di ribavirina costanti durante le settimane di trattamento. [78]

I livelli di linfociti CD4 al contrario non sono risultati essere in grado di influire sull'outcome terapeutico in nessuno degli studi [78], considerando in ogni caso che vengono trattati solo pazienti con livelli di CD4+>200 cell/mL.

Forse il risultato più significativo è stato quello relativo all'early virological response, l'assenza del quale ha dimostrato di avere un valore predittivo negativo prossimo al 100% nei confronti di una successiva risposta virologica sostenuta. [78]

Infine anche il concomitante impiego della HAART ha dimostrato essere legato ad una maggiore probabilità di recidiva dell'infezione dopo iniziale negativizzazione della carica virale.

1.3. GENETICA DELL'OSPITE NELL'INFEZIONE DA VIRUS C

1.3.1. Introduzione: ruolo della genetica dell'ospite nelle malattie infettive

Le malattie infettive rappresentano un problema sanitario di portata mondiale, sia in termini di mortalità che di morbidità. La complessa interazione di fattori legati all'ambiente, legati al patogeno e legati all'ospite rivestono ruoli importanti nell'influenzare sia la suscettibilità individuale a differenti microorganismi, sia il decorso dell'infezione. [80]

In modo particolare, la conoscenza del ruolo che la genetica dell'ospite gioca nella patogenesi delle infezioni risulta attualmente in espansione grazie ai notevoli progressi compiuti negli ultimi anni nel campo della genomica. L'importanza di nuove scoperte in questo ambito è soprattutto legata alla possibilità di sviluppare nuove strategie terapeutiche nel campo dell'infettivologia. [81]

Lo sviluppo dei cosiddetti "Genome Wide Association Studies" ha permesso di svolgere delle scansioni complete dei polimorfismi del genoma umano, con il vantaggio che i geni da studiare non vengono selezionati in base a supposizioni circa il loro ruolo, ma al contrario, la scansione allargata del genoma può far emergere l'importanza di nuovi loci, precedentemente non considerati. [82]

Le conoscenze attuali confermano l'ipotesi che la suscettibilità dell'ospite alle malattie infettive abbia un'eredità poligenica, e solo una minoranza dei loci è stata ad oggi studiata.

Ulteriori studi e nuove conoscenze in questo campo potranno essere di fondamentale importanza per l'identificazione di *target* per nuove terapie, o per la messa a punto di nuove strategie vaccinali. Un'altra prospettiva futura può essere quella di arrivare a delineare un profilo di rischio personalizzato per ogni singolo paziente che possa predire la sua specifica suscettibilità a vari agenti infettivi. Estendendo tale approccio alla farmacogenomica si potrebbe arrivare a definire uno schema di immunoterapia personalizzato sulla base del profilo genetico dell'ospite. [80]

1.3.2. I GWAS

I "Genome-wide association study" hanno aperto nuove promettenti prospettive nel campo della genetica. Questo tipo di studio esamina le variazioni genetiche presenti nel genoma

umano con l'intento di stabilire una correlazione tra queste e vari tratti fenotipici; si avvale di nuove tecniche di genotipizzazione che consentono di valutare centinaia di migliaia di polimorfismi di singolo nucleotide lungo l'intero genoma. Lo studio prevede di selezionare una popolazione di individui affetti dalla patologia o dal tratto fenotipico d'interesse, oltre che un gruppo di controllo; si procede in seguito all'isolamento del DNA e alla valutazione degli SNPs, seguita dall'analisi statistica atta a stabilire se esista una qualche associazione significativa tra questi e il tratto fenotipico d'interesse. L'ultimo passo prevede di replicare lo studio in un ulteriore campione di pazienti per poter confermare i risultati ottenuti.

1.3.3. Importanza della genetica dell'ospite nell'infezione da virus C

Come precedentemente visto, l'infezione da HCV può dare quadri clinici assai eterogenei: l'infezione acuta è spesso asintomatica, ma può talvolta avere le caratteristiche di un'epatite acuta; la cronicizzazione dell'infezione, invece, è evento frequente, ma non certo. Anche tra coloro che sviluppano un'epatite cronica, il decorso dell'infezione è assai variabile, spaziando da lievi o nulli rialzi delle transaminasi, asintomatici e privi di danno epatico, a quadri di rapida progressione verso la cirrosi e l'epatocarcinoma. Anche la risposta alla terapia combinata è variabile, compresa tra il 50 e l'80% a seconda del genotipo virale.

Si è visto come fattori virali (primo tra tutti il genotipo), epidemiologici (età, sesso, razza, coinfezione con HIV), comportamentali (soprattutto l'abuso alcolico) abbiano un ruolo nell'influenzare il decorso dell'infezione e la risposta alla terapia; però questi spiegano solo una parte di tale variabilità.

Da questo deriva il sempre crescente interesse verso i fattori genetici dell'ospite come fattori in grado di spiegare la restante parte della variabilità del decorso dell'infezione da virus C. Studi tra gemelli monozigoti suggeriscono che la genetica dell'ospite possa influenzare fino al 50% di tale variabilità.

Progressi in questo campo sono più che auspicabili in quanto potrebbero portare ad acquisire gli strumenti utili a delineare un profilo di rischio personalizzato per ogni singolo paziente, oltre che focalizzare l'attenzione su nuovi *target* terapeutici.[83]

Molti studi si sono concentrati sulla identificazione di geni potenzialmente candidati ad avere un ruolo nella suscettibilità individuale alle infezioni.

Studi con i GWAS sono stati recentemente impiegati per valutare se esistano polimorfismi di singolo nucleotide associati alla risposta (o alla non risposta) alla terapia combinata con interferone e ribavirina in pazienti affetti da epatite C cronica.

Definire, nell'ambito dell'infezione da HCV, dei fattori genetici su cui poter contare come strumenti clinico-diagnostico-terapeutici è un obiettivo che nel recentissimo periodo si è fatto sempre più plausibile grazie agli studi condotti su polimorfismi a carico di diversi geni come il gene IL-28B e il gene SLC29A.

1.3.4. IL-28B

Ben quattro GWAS hanno messo in luce il ruolo significativo di alcuni SNPs in prossimità o in corrispondenza del gene dell'IL-28B, che codifica per una particolare citochina che prende il nome di interferone $\lambda 3$, nella risposta alla terapia anti-HCV. Il ruolo di tali polimorfismi come predittori di risposta alla terapia combinata sembrerebbe superare quello di qualsiasi altro predittore noto, epidemiologico o genetico, in pazienti con infezione da genotipo virale 1.

Alcuni di questi SNPs sono stati studiati anche in pazienti spontaneamente guariti dall'infezione messi a confronto con individui con epatite cronica, dimostrando di avere un ruolo altrettanto significativo come predittori dell'andamento naturale dell'infezione.

Questi risultati sono incredibilmente promettenti da un punto di vista di stratificazione prognostica per quanto riguarda la risposta alla terapia combinata, oltre che da un punto di vista della messa a punto di nuove strategie terapeutiche potenzialmente basate sull'utilizzo dell'interferone lambda. [84]

1.3.4.1. Funzione di IL-28B:

Il gene IL-28B si trova sul cromosoma 19 e codifica per una particolare citochina che prende il nome di interferone- $\lambda 3$. I geni IL28A e IL29 si trovano adiacenti a IL28B e codificano rispettivamente per IFN- $\lambda 1$ e IFN- $\lambda 2$. Questi tre interferoni- λ sono stati scoperti nel 2003 e fin da subito è stato suggerito che potessero essere coinvolti nella soppressione della replicazione di numerosi virus, tra cui HCV.

1.3.4.2. I differenti tipi di Interferoni

L'interferone fu la prima citochina ad essere scoperta da Isaac e Lindenmann nel 1957; fu anche la prima citochina ad essere purificata, clonata, interamente sequenziata e prodotta in forme ricombinanti che hanno trovato estesa applicazione a livello clinico. Con la scoperta dell'esistenza di differenti isoforme della molecola, gli interferoni sono stati classificati in tre gruppi distinti, il tipo I, II e III, sulla base della sequenza aminoacidica. Tra i mammiferi gli interferoni di tipo I costituiscono una famiglia multigenica di almeno 8 sottoclassi: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- τ , IFN- δ , IFN- ζ e tra questi i primi cinque sono caratteristici del genere umano in cui l'IFN- α è presente in ben 13 sottotipi. L'IFN- τ e - δ sono invece prodotti rispettivamente dall'ectoderma dei ruminanti e dal trofoblasto dei maiali, mentre l'IFN- ζ è stato per ora isolato solo nei topi.

Gli IFN di tipo II includono un solo sottotipo, l'IFN- γ .

Recentemente è stata scoperta l'esistenza di un nuovo gruppo di interferoni da due gruppi di ricerca americani che conducevano ricerche indipendenti nello stesso campo (Kotenko e Gallagher del New Jersey e il gruppo di Klucher di Seattle). Si tratta della famiglia degli Interferoni- λ la quale riconosce tre membri principali: l'IFN- $\lambda 1$, $\lambda 2$ e $\lambda 3$. La loro struttura genomica ricorda quella della famiglia dell'IL-10, ragion per cui tali molecole sono per altro anche note come IL-29 (IFN- $\lambda 1$), IL-28A (IFN- $\lambda 2$) e IL-28B (IFN- $\lambda 3$). Da un punto di vista funzionale tali molecole sono però molto più strettamente correlate agli interferoni di tipo I piuttosto che a IL-10, in quanto in grado di attivare ISRE (Interferon-Stimulated Response Element) e di indurre un effetto antivirale. Gli interferoni λ sono attualmente denominati IFN di tipo III.

1.3.4.3. I geni degli interferoni e la loro espressione

I geni che codificano per i tre membri della famiglia degli IFN- λ si trovano sul cromosoma 19 e tale localizzazione differisce da quella dei geni degli IFN di tipo I i quali mappano invece a livello del cromosoma 9. In analogia con la famiglia dei loci genici di IL-10, anche i loci degli IFN- λ includono diversi esoni, sei per l'IFN- $\lambda 2$ e cinque per l'IFN- $\lambda 1$ e - $\lambda 3$. Tale condizione non è invece caratteristica degli IFN di tipo I che sono codificati da un singolo esone. L'IFN- $\lambda 2$ e - $\lambda 3$ sono virtualmente identici, condividendo fino al 96% della sequenza aminoacidica, mentre l'IFN- $\lambda 1$ ha con essi l'81% di omologia.

L'espressione dell'IFN- λ è stata rilevata a bassi livelli nel sangue, nel tessuto cerebrale, nel polmone, nell'ovaio, nel pancreas, nella placenta, nell'ipofisi, nella prostata e nel testicolo.

L'espressione di tali IFN, così come quella degli IFN di tipo I, è stimolata dalle infezioni virali, condizioni in cui i due tipi di citochine sono compresenti a livello della cellula infettata. Nonostante virtualmente qualsiasi tipo cellulare, in seguito ad infezione virale, possa andare incontro all'espressione dell'IFN- λ , i PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) e i MDDC (Monocyte-Derived Dendritic Cells) sembrano essere le principali linee coinvolte nella produzione di tali citochine. L'IFN- α ha inoltre un'effetto di regolazione positiva nei confronti dell'IFN- λ .

1.3.4.4. Funzioni degli IFN

L'attività biologica degli IFN- λ è parzialmente sovrapponibile a quella degli IFN- α e include un'attività antivirale, una antitumorale e un'azione immunomodulatrice.

Per quanto riguarda l'attività antivirale è stato dimostrato che gli IFN di tipo III sono in grado di stimolare l'espressione degli MHC di classe I a livello di diversi tipi cellulari oltre che di indurre l'espressione di numerose proteine in grado di svolgere un'azione protettiva nei confronti di diversi tipi di virus. Alcuni studi hanno evidenziato come topi knock out per IFN- λ R1 differissero dai topi wild-type in relazione all'incapacità a rispondere a numerose infezioni virali. La risposta all'IFN- λ risulta però limitata ad alcune linee cellulari tra cui le cellule dendritiche plasmocitoidi e le cellule epiteliali.

A proposito dei virus epatitici esistono evidenze che gli interferoni di tipo III siano in grado di inibire la replicazione virale di HBV e HCV, grazie alla dimostrata presenza di IFN- λ R a livello della membrana dell'epatocita. Zhu e colleghi hanno dimostrato che l'IFN- λ inibisce la replicazione di HCV: trattando cellule dell'epatoma umano con tale interferone hanno osservato l'attivazione delle vie di trasduzione dipendenti da STAT oltre che la trascrizione di alcuni geni specifici (ISGs Interferon Stimulated Genes) e l'aumento dell'espressione delle molecole MHC I sulla superficie cellulare. [85] Nonostante l'attivazione delle stesse vie di trasduzione intracellulari, l'IFN- λ ha un'azione antivirale più debole rispetto all'IFN- α ma induce d'altra parte un'attivazione più rapida della via di STAT e un effetto più prolungato sull'espressione di diversi ISGs. Tale differenza, unitamente alle evidenze in vitro che l'attività di ciascun interferone ($-\alpha$ e $-\lambda$) è stimolata da basse dosi dell'altro, suggeriscono che le due citochine possano avere un ruolo parzialmente complementare nella soppressione della replicazione di HCV. [86]

Tra le funzioni degli IFN di tipo III va ricordata anche l'azione antiproliferativa, dimostrata in diverse linee cellulari di derivazione dagli astrocitomi e glioblastomi umani oltre che in cellule di timoma murino positive per IFN- λ R umano.

Gli effetti immunomodulatori degli IFN- λ si sovrappongono a quelli degli IFN- α e includono la stimolazione dell'attività citotossica delle cellule NK e T, la promozione della risposta Th1, l'espressione di molecole del complesso MHC di classe I sulla superficie cellulare in modo da promuovere la presentazione antigenica e il ruolo di mediazione nell'apoptosi. Le azioni immunoregolatrici degli IFN di tipo III sono ristrette ad alcuni tipi cellulari, in funzione della distribuzione limitata di IFN- λ R, come esposto in precedenza. [85]

1.3.4.5. Studi condotti su IL-28B

Uno dei primi studi in merito è stato quello americano di Ge e colleghi, i quali hanno condotto un GWAS su un gruppo di 1600 pazienti HCV positivi infettati con il genotipo 1 che avevano effettuato la terapia combinata con Interferone pegilato e Ribavirina.

Un polimorfismo di singolo nucleotide sul cromosoma 19, *rs12979860*, si è dimostrato fortemente associato con la Risposta Virologica Sostenuta in tutti i vari gruppi etnici inclusi nella popolazione campione, tra cui Americani-Europei, Afro-American e Ispanici. Tale SNP è localizzato 3 kilobasi a monte del gene dell'IL28B.

In particolare il genotipo CC (omozigosi recessiva) è risultato essere associato a tassi di RVS notevolmente maggiori ($p=1,37 \times 10^{-28}$) in tutti i gruppi etnici analizzati dallo studio (le percentuali di SVR sono state pari all'83%, 53% e 77% rispettivamente negli Americani-Europei, Afro-American e Ispanici portatori del genotipo CC). Il tasso di SVR nei differenti gruppi etnici ha dimostrato di avere un'elevata concordanza con la frequenza dell'allele C negli stessi gruppi (Asiatici > Americani-Europei > Ispanici > Afro-American) e tale variazione genetica sembrerebbe spiegare gran parte della differenza nella risposta alla terapia tra Afro-American ed Europei. L'analisi statistica dei dati ha messo in luce come il genotipo CC sia associato alla RVS in pazienti infettati con genotipo 1 molto più di qualsiasi altro predittore considerato (carica virale, fibrosi epatica, etnia). [87]

In uno studio successivo sempre americano, condotto da Thomas e colleghi, è stato dimostrato come l'allele minore C dello stesso polimorfismo sia molto più frequente tra i pazienti che guariscono spontaneamente dall'infezione da HCV, rispetto a quelli che sviluppano un'infezione cronica, sia tra gli Europei che tra gli Afro-American (80,3% vs

66,7%; $p=7 \times 10^{-8}$ e 56,2% vs 37%; $p=1 \times 10^{-5}$, rispettivamente). Gli individui con genotipo CC avevano una probabilità di guarigione spontanea dall'infezione tre volte maggiore rispetto a quelli con genotipo CT o TT (OR:0,33 $p<10^{-12}$). [88]

In un simile GWAS, Suppiah e colleghi hanno studiato nuovamente il ruolo della genetica come predittore di *clearance* virale di HCV dopo terapia combinata. La popolazione studiata era australiana di origini Nord Europee, ancora una volta infettata con genotipo 1 e comprendeva 162 “non responders” alla terapia con Peg-interferone e ribavirina e 131 “responders”. I risultati sono stati poi replicati in una popolazione più grande indipendente di soggetti europei provenienti da Germania, Inghilterra, Italia e Australia.

Un polimorfismo di singolo nucleotide, **rs8099917**, nella regione compresa tra il gene IL-28A e IL-28B, ha dimostrato di essere associato alla risposta alla terapia con “significatività genomica” ($p=7,06 \times 10^{-8}$; OR: 3,36; IC 95%: 1,57-2,52)

In particolare l'allele minore G di tale SNP è risultato essere predittivo di non risposta virologica alla terapia con una sensibilità del 57% e una specificità del 63%, con l'associazione più forte osservata nei casi di omozigosi GG. Per i portatori dell'allele “di non risposta” (G), il valore predittivo positivo (per il fallimento terapeutico) era del 64%.

Come risultato dell'analisi multivariata che ha preso in considerazione la carica virale, la fibrosi epatica, l'età e il sesso dei pazienti, lo SNP **rs8099917** ha dimostrato di essere un predittore indipendente di risposta alla terapia ($p<0,0001$) e non c'era evidenza di influenza da parte degli altri fattori confondenti considerati.

Gli stessi autori hanno inoltre analizzato l'espressione costitutiva di IL-28A e IL-28B nel sangue periferico di individui sani e hanno osservato come tale espressione genica sia molto inferiore nei portatori dell'allele G. [89]

Tanaka e colleghi hanno condotto un GWAS in pazienti giapponesi infettati con genotipo 1 e trattati con terapia combinata, per un totale di 78 NR e 64 SVR. Lo studio ha inizialmente individuato due polimorfismi localizzati in prossimità del locus di IL-28B, in forte associazione con la Non Risposta alla terapia combinata. Si tratta di **rs12980275** e **rs8099917**: gli alleli minori di tali SNPs (Guanine) sono associati alla non risposta alla terapia in maniera assai significativa (rs12980275: $p=1,93 \times 10^{-13}$; rs8099917: $p=3,11 \times 10^{-15}$). La frequenza degli alleli minori era molto più elevata nel gruppo dei NR rispetto a quello dei SVR (74,3%

tra i NR e 12,5% tra i SVR per rs12980275; 76,6% tra i NR e 9,4% tra i SVR per rs8099917) e gli individui in omozigosi per l'allele minore G sono stati osservati solo nel gruppo dei NR.

Lo SNP rs8099917 è lo stesso che era stato identificato da Suppiah e colleghi.

Anche in questo studio è stata dimostrata una minore espressione dell'mRNA di IL28B nelle cellule mononucleate del sangue periferico di individui portatori dell'allele minore.

In seguito, durante la fase di replicazione dello studio in una popolazione indipendente, Tanaka e colleghi hanno innanzitutto confermato il ruolo di rs12980275 e rs8099917 rispetto all'associazione con la non risposta virologica alla terapia (rs12980275: $p=3,99 \times 10^{-24}$; OR: 18,5; rs8099917: $p=1,11 \times 10^{-27}$; OR: 27,2) e hanno inoltre identificato sei ulteriori polimorfismi dotati di un ruolo significativo, sempre in corrispondenza del locus di IL-28B (*rs8105790*, *rs11881222*, *rs8103142*, *rs28416813*, *rs4803219*, *rs7248668*). L'analisi statistica ha poi identificato l'allele minore di rs8099917 come il più significativo fattore predittivo di "Null Virologic Response" tra tutti gli SNPs considerati. [90]

Un ulteriore studio a proposito del ruolo di IL28B rispetto all'andamento dell'infezione da virus C è stato condotto in Svizzera da Rauch e colleghi su 1362 pazienti: 1015 con epatite cronica C e 347 che erano spontaneamente guariti dall'infezione. I pazienti con epatite cronica erano stati trattati con terapia combinata, raggiungendo la SVR in 465 casi. Tra i pazienti reclutati 448 erano coinfetti HCV-HIV. Per la prima volta sono stati inoltre considerati tutti i genotipi di HCV.

Il GWAS ha ancora una volta messo in luce il ruolo di *rs8099917*, ma questa volta anche rispetto al decorso naturale dell'infezione: l'allele minore G dello SNP è risultato infatti essere associato con la progressione ad epatite cronica (OR=2,31; IC 95%: 1,74-3,06; $p=6,07 \times 10^{-9}$). L'associazione è stata osservata nei monoinfetti (OR: 2,49; IC 95%: 1,64-3,79; $p=1,96 \times 10^{-5}$) e anche nei coinfetti HIV-HCV (OR: 2,16; IC 95%: 1,47-3,18; $p=8,24 \times 10^{-5}$). Rs8099917 è stato inoltre nuovamente associato con il fallimento terapeutico (OR: 5,19; IC 95%: 2,90-9,30; $p=3,11 \times 10^{-8}$), con effetti più significativi nei pazienti con genotipi 1 e 4.

L'allele minore G è stato identificato nel 24% degli individui guariti spontaneamente dall'infezione, nel 32% dei portatori cronici che hanno risposto alla terapia combinata e nel 58% dei "non-responders" ($3,2 \times 10^{-10}$). Le frequenze relative dei genotipi TT, GT e GG erano 0.58, 0.37 e 0.05 tra i pazienti con infezione cronica; 0.78, 0.21 e 0.01 tra coloro che erano guariti spontaneamente dall'infezione; 0.42, 0.51 e 0.07 tra i NR alla terapia; 0.68, 0.29 e 0.03 tra i SVR rispettivamente.

Risequenziando il gene IL28B sono stati infine identificati distinti aplotipi fortemente associati con il fenotipo clinico.

Non è stata identificata un'associazione significativa tra lo SNP in questione e la risposta alla terapia in pazienti con genotipo 2 e 3, a suggerire che il valore prognostico dell'allele possa essere limitato agli individui con genotipi difficili da trattare (1 e 4).

Gli autori hanno inoltre stimato la frequenza dell'allele minore nella popolazione generale dei Caucasici pari a circa il 15%, con una variabilità del 2-31% nelle diverse etnie.

In conclusione ancora una volta IL28B è stato individuato come il principale determinante genetico per il controllo dell'infezione da HCV. Nessuno SNP al di fuori del gene di IL28B ha raggiunto livelli di significatività nel GWAS. [91]

Un altro recente studio condotto in North Carolina da McCarthy e colleghi, considerando tutti i dati emersi in letteratura dai suddetti GWAS, ha indagato il ruolo di **rs12979860** rispetto alla SVR in 231 pazienti monoinfetti trattati. Il genotipo CC è risultato predittivo di SVR tra i caucasici (OR: 5,79; IC 95%: 2,67-12,57; $p=9,0 \times 10^{-6}$) indipendentemente dal genotipo virale e da tutti gli altri fattori confondenti. Il polimorfismo rs12979860 CC è stato in grado di predire la risposta alla terapia con il 78% di specificità e il 65% di sensibilità in pazienti infettati con genotipo 1. [92]

Un ulteriore studio ha messo in evidenza che uno SNP (rs8103142) nell'esone 2 di IL28B è associato alla clearance di HCV in una coorte di pazienti HIV positivi. Questo studio ha suggerito che anche altri 2 SNP, rs12979860 e rs11881222 localizzati rispettivamente nel promotore e nel secondo introne di IL-28B sono in forte linkage disequilibrium con il precedente che è associato con la clearance. Nello specifico sono stati presi in considerazione 206 pazienti europei HIV positivi con una evidente infezione da HCV di cui 47 (23%) avevano eliminato il virus, mentre 159 (77%) avevano sviluppato l'infezione cronica. Quello che si è visto che il genotipo CT di rs8103142, CT di rs12979860 e AG di rs11881222 sono associati alla clearance di HCV con odds ratio di 0,3 (IC 95% 0,1-0,7), 0,4 (IC 95% 0,2-0,8) e 0,4 (IC95% 0,2-0,8) rispettivamente. Inoltre è stata riscontrata anche una differenza significativa nei livelli di HCV RNA tra gli individui con infezione cronica da HCV con genotipo 1 per rs8103142 e rs12979860 ($P<0,05$). Soggetti con genotipo 3 di HCV e con aplotipo favorevole avevano valori mediani di HCV RNA maggiori rispetto agli individui con aplotipo sfavorevole ($P<0,05$).

1.3.5. SLC29A

Il gene SLC29A codifica per quattro proteine indicate col nome ENT1-4.

ENT1 è la principale proteina coinvolta nell'assorbimento cellulare della ribavirina. La ribavirina è un analogo nucleotidico sintetico della guanosina che inibisce la replicazione di virus a DNA e RNA dopo essere trifosforilato da enzimi cellulari. Sono stati proposti diversi meccanismi di azione per spiegare i suoi effetti anti HCV, includendo l'inibizione diretta della RNA polimerasi virale, l'inibizione della inosina monofosfato deidrogenasi, l'ipermutagenesi, immunoregolazione e modulazione dei geni stimolati dall'interferone. [93][94] Sebbene non è esattamente chiaro come la ribavirina blocchi la replicazione di HCV, quasi tutti questi meccanismi di azione richiedono un adeguato importo di ribavirina negli epatociti.

La ribavirina è trasportata nelle cellule da trasportatori nucleosidici, che sono proteine di membrana, specializzate e integrate, che mediano l'afflusso fisiologico di nucleosidi e basi azotate, come anche altri analoghi sintetici.

Questi trasportatori sono classificati in due famiglie: 1- trasportatori nucleosidici equilibrativi (ENT), che vanno da 1 a 4, codificati dai geni SLC29A (sempre da 1 a 4) che mediano la diffusione bidirezionale dei nucleosidi e delle basi azotate, basata su gradiente elettrochimico; 2- trasportatori nucleosidici concentrativi (CNT) che vanno da 1 a 3, codificati dai geni SLC28A (sempre da 1 a 3), che mediano il flusso unidirezionale contro gradiente chimico, con un meccanismo sodio-dipendente.

Studi in vitro hanno dimostrato che la ribavirina può essere trasportata da ENT1, ENT2, CNT2 e CNT3.[95] Il contributo di ognuno di questi trasportatori all'assorbimento cellulare della ribavirina, varia nei distinti tessuti. Negli epatociti ed eritrociti, che sono i due principali compartimenti cellulari per l'accumulo di ribavirina, la ribavirina è principalmente trasportata da ENT1. [96][97][98][99][100]

1.3.5.1. Studi condotti su ENT1

Sono stati esaminati specifici polimorfismi nel gene SLC29A1, per vedere se influiscono l'espressione epatica e la funzione di ENT1, influenzando l'esposizione intracellulare alla ribavirina, e potenzialmente la sua attività antiretrovirale contro HCV.

In un recente studio [101] è stato dimostrato che uno SNP (rs760370) nel gene SLC29A 1, localizzato sul cromosoma 6, che codifica per il trasportatore nucleotidico ENT1 coinvolto nel trasporto della ribavirina negli epatociti, influenza significativamente il tasso di risposta

virologica alla terapia nei pazienti coinfecti. Lo studio ha preso in considerazione 109 pazienti con coinfezione HIV-HCV, con genotipo 1 o 4 di HCV, che hanno preso la terapia pegIFN-ribavirina. Pazienti con genotipo GG nello SNP rs760370 avevano una probabilità maggiore di RVR (Risposta Virologica Rapida) alla terapia rispetto al resto dei pazienti. In questo studio sono stati identificati 5 SNPs: rs1057985, rs9394992, rs 324148, rs324149 e rs760370, di cui solo l'ultimo ha dato dei risultati significativi.

L'impatto dello SNP rs760370 nel gene SLC29A1 nell'espressione del trasportatore ENT1 è ignoto. Questo SNP è localizzato nella regione non codificante del gene (introne 12) e potrebbe promuovere uno splicing alternativo o potrebbe essere in linkage disequilibrium con un altro polimorfismo, non ancora identificato, associato con l'espressione e l'attività di ENT1. Dato che ENT1 è il principale trasportatore della ribavirina negli epatociti, è stato ipotizzato che cambiamenti nell'espressione o nell'attività di questo trasportatore potrebbe influenzare la concentrazione intraepatica della ribavirina e quindi l'attività antiretrovirale. Tuttavia, deve esser noto che ENT1 è anche espresso nell'epitelio intestinale e renale e quindi l'assorbimento intestinale della ribavirina dai siti di assorbimento ed escrezione potrebbero essere influenzati dai polimorfismi del gene SLC29A1. A questo riguardo, è notevole che sia le concentrazioni depresse della ribavirina sierica che lo SNP in SLC29A1 siano entrambi indipendentemente associati con il raggiungimento dell'RVR in questo studio, che suggerisce che le concentrazioni sieriche di ribavirina, ma principalmente l'esposizione intraepatica di ribavirina, determinano la sua attività antiretrovirale.

L'associazione tra il genotipo GG di rs760370 e il raggiungimento dell'RVR non è stato confermato dalla valutazione SVR nonostante il valore predittivo consolidato di RVR per SVR, è confermato in questo studio. Bisogna notare che SVR era raggiunto nel 39% dei pazienti, mentre solo il 21% erano RVR. Quindi, sebbene il 96% dei pazienti con risposta virologica rapida (RVR), raggiungevano la risposta virologica sostenuta (SVR), fino al 45% dei pazienti SVR non avevano RVR. Andando ad estendere la terapia oltre le 48 settimane, come raccomandato in questo studio, per coloro che non raggiungevano l'RVR, si potrebbe spiegare la minor associazione tra lo SNP e la SVR, in contrasto con la prevista risposta virologica.

In altre parole, sembra che l'impatto dello SNP potrebbe essere almeno parzialmente superato aumentando il tempo di terapia, quando non vi è una risposta alle settimane 12 e 24.

Altra possibile spiegazione potrebbe essere una maggiore carica virale per HCV, tipicamente osservata nei pazienti coinfecti, che può compromettere le possibilità di raggiungere la

clearance a 4 settimane, pur avendo una buona risposta virologica. Una lenta diminuzione di HCV-RNA in risposta alla terapia [102] può accentuare ulteriormente questo effetto.

Come accennato in precedenza, il genotipo GG di rs760370 e una diminuzione nella concentrazione di ribavirina $> 12,5$ ug /mL sono stati entrambi associati in modo indipendente con RVR in questa popolazione di coinfezioni. Questo mette in evidenza il ruolo essenziale della ribavirina nella clearance da HCV. Studi di farmaco genomica e di farmacodinamica condotti sia su monoinfezioni HCV, che in pazienti con infezione HCV-HIV hanno trovato una correlazione tra le concentrazioni plasmatiche di ribavirina e il raggiungimento di entrambi RVR e SVR.[103][104]

Sempre in questo studio, i risultati hanno sostenuto che una combinazione di parametri di farmaco genomica e farmacodinamica della ribavirina potrebbe consentire la massima verosimiglianza di risposta virologica alla terapia pegIFN-ribavirina.

La presenza del genotipo GG in pazienti infettati con genotipo virale 1 o 4, che sono i più difficili da trattare, può, quindi incoraggiare il loro trattamento, soprattutto in presenza di fibrosi epatica avanzata. Al contrario, sarebbe preferibile non trattare quei soggetti che invece presentano un meno probabile successo nella terapia, in quanto presentano genotipo AA o AG e che hanno una fibrosi epatica minima. Per questo sottogruppo di individui sarà preferibile aspettare un nuovo trattamento antiretrovirale contro HCV. [102]

Questo studio ha però diversi limiti, tra cui la dimensione limitata della popolazione in studio e il piccolo numero di SNPs trattati. Ci sono sicuramente altri geni che potrebbero influenzare la risposta alla terapia peg-IFN e ribavirina, come per esempio IL-28B [105][106][107][108][109] Inoltre in aggiunta alle varianti genetiche, anche altri fattori, non presi in considerazione, potrebbero influenzare l'espressione e/o l'attività di ENT1 come farmaco, tra cui per esempio, l'interazione con gli alimenti, l'HIV e l'HAART. Infine, anche se ENT1 è considerato il trasportatore primario della ribavirina negli epatociti, altri trasportatori, come ENT2 e CNT2 potrebbero avere un ruolo che in questo studio non è stato valutato. Inoltre meccanismi di compensazione potrebbero aumentare l'attività dei trasportatori nucleosidici alternativi, nel caso l'assunzione di ribavirina mediata da ENT1 sia ridotta.[110]

Questo dovrebbe essere il primo studio che si è interessato a valutare l'impatto degli SNPs del gene SLC29A1 sulla risposta alla terapia peg-IFN ribavirina. Alla luce dei recenti studi sul forte impatto degli SNPs vicini al gene IL28B e alla suscettibilità al pegIFN [105][106][107][108][109] questi risultati suggeriscono che l'attività della ribavirina può

analogamente essere influenzata dagli SNPs nel gene SLC29A1. Ulteriori studi sono comunque necessari per confermare questi risultati in diverse popolazioni con infezione da HCV, soprattutto di monoinfetti e in soggetti con genotipo diverso da 1 e 4.

2. SCOPO DELLA TESI

Nonostante ulteriori studi siano necessari per chiarire i meccanismi funzionali che sottostanno all'associazione tra variazioni genetiche di IL28B e controllo dell'infezione da virus C, è ormai chiaro che il genotipo CC in corrispondenza dello SNP *rs12979860* è associato in maniera assai significativa con la risposta virologica alla terapia combinata in pazienti con genotipo 1 così come con la *clearance* spontanea dell'infezione, e che l'allele minore G a livello degli SNPs *rs8099917* e *rs12980275* e *rs11881222* è significativamente associato con il cosiddetto "Null Virologic Response".

Dagli studi su ENT1, invece, è emerso che in pazienti con genotipo virale 1 o 4 trattati con PEG-INR e ribavirina, lo SNP rs760370 potrebbe influenzare l'attività della ribavirina nella terapia anti-HCV. Il raggiungimento della risposta virologica rapida era maggiormente presente nei GG rispetto ai portatori AA/AG (50% vs 17% p=.007). Quindi questo potrebbe influenzare la risposta, modulando l'esposizione della ribavirina intracellulare negli epatociti.

Alla luce di quanto detto fino ad ora lo scopo di questa tesi sarà valutare il ruolo della genetica nella risposta alla terapia anti-HCV e nella *clearance* spontanea di HCV nei pazienti con coinfezione da HIV-1.

In particolare si valuterà se i polimorfismi di singolo nucleotide rs12979860, rs8099917, rs12980275 e rs11881222 del gene dell'IL28B risultano associati alla *clearance* spontanea di HCV e alla risposta virologica sostenuta alla terapia con interferone- α e ribavirina. E se il polimorfismo rs760370 di ENT1 abbia un ruolo nella risposta alla terapia.

Inoltre verrà analizzata l'espressione di IL28b e IL28a in PBMC, in modo da analizzare una possibile correlazione tra i dati ottenuti per i diversi polimorfismi, l'evoluzione della malattia e l'espressione di questi geni.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Pazienti

Per il nostro studio sono stati arruolati 320 pazienti. Di questi 276 era coinfecti HCV-HIV ed hanno intrapreso la terapia per HCV con Interferone peghilato e Ribavirina, mentre 44 erano monoinfecti HIV che hanno eliminato il virus HCV in modo spontaneo. Dei 276 pazienti, 80 erano seguiti presso la Clinica delle Malattie Infettive dell'Ospedale Luigi Sacco di Milano, 137 erano in cura presso l'Ospedale San Raffaele della stessa città e 59 fanno parte del progetto ICONA. I 44 pazienti che hanno presentato clearance spontanea sono tutti seguiti presso l'ospedale L. Sacco di Milano. Sono stati selezionati esclusivamente pazienti che abbiano intrapreso la terapia combinata con Interferone Pegilato e Ribavirina per l'epatite cronica o quelli che siano spontaneamente guariti dall'infezione da virus C. Non sono al contrario stati presi in considerazione i pazienti che abbiano interrotto la terapia combinata prima del termine prestabilito, a causa dell'insorgenza di effetti collaterali o della mancanza di aderenza.

Tutti i pazienti selezionati hanno firmato un consenso informato in seguito all'approvazione dello studio da parte del Comitato Etico.

3.2. Separazione di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs) con tecnica di gradiente di densità (FICOLL).

Partendo dal sangue intero di pazienti coinfecti HIV-HCV è stata effettuata la separazione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) mediante tecnica a gradiente di densità.

I linfociti umani possono essere isolati molto velocemente dal sangue periferico tramite centrifugazione basata sulla densità, con un gradiente che comprende una misura di carboidrati polimerici FicollTM e iodio denso che contiene il composto metrizamide. Questo ci permette di avere una popolazione di cellule mononucleate all'interfaccia che è stata purificata dagli eritrociti e dalla maggior parte dei leucociti polimorfonucleati o dei granulociti. La popolazione ottenuta, chiamata cellule mononucleate del sangue periferico, consiste principalmente di linfociti e monociti. Sebbene questa popolazione sia facilmente accessibile, non è rappresentativa del totale del sistema linfoide, poiché solo i linfociti circolanti possono essere isolati dal sangue.

3.3. Estrazione di DNA genomico da PBMC

Da queste cellule è stato poi estratto il DNA utilizzando il kit della Roche *High Pure PCR Template Preparation Kit – Roche (Version December 2008)*. Il DNA così isolato è stato risospeso in DNase free water e testato allo spettrofotometro (Nanodrop) per la concentrazione.

3.4. Estrazione di RNA da PBMC e sintesi di cDNA.

Pellet da cinque milioni di PBMC sono stati risospesi in RNA protect cell Reagent (Qiagen) e conservati a -80° fino all'estrazione di RNA. Il metodo usato è stata un'estrazione con fenolo-cloroformio che prevede l'utilizzo del Trizol (Invitrogen) come soluzione di lisi. La sintesi del cDNA è stata fatta con 500 ng dell'RNA totale utilizzando il kit dell'Invitrogen *Super script III First-Strand Synthesis Super mix for qRT-PCR*.

3.5. Genotipizzazione tramite PCR real time

La genotipizzazione dei 5 polimorfismi (rs12979860, rs8099917, rs12980275 e rs11881222 per IL-28 e rs760370 per SLC29A1) è stata eseguita tramite l'utilizzo della *PCR real time*, con metodo dual-labeled probes. Si tratta di una metodica che consente di effettuare simultaneamente l'amplificazione e la quantificazione del DNA e che viene anche denominata PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale.

Così come avviene nella PCR classica, anche nella "*real-time*" il segmento di DNA d'interesse, riconosciuto da specifici *primers*, viene amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi in numerosi cicli successivi. A differenza di quanto accade nella PCR tradizionale però, con il metodo quantitativo è possibile valutare immediatamente in maniera visiva su un *monitor* il risultato dell'amplificazione grazie all'introduzione, nella miscela di reazione, di sonde rivelatrici di fluorescenza la quale viene rilevata ed elaborata da appositi *software*.

In particolare il meccanismo di rilevazione del segnale di fluorescenza si basa sul principio del *FRET Quencing (FRET=Fluorescence Resonance Energy Transfer)*: in base a questo metodo, la valutazione quantitativa dell'acido nucleico è affidata alla rilevazione e alla conseguente quantificazione di un "*reporter*" fluorescente il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità di prodotto di PCR nella reazione.

A tal proposito viene disegnata la sonda gene-specifica (una specifica per l'allele mutato e una specifica per il wild-type) che si appaia nella zona compresa fra i due *primer* (*forward* e *reverse*). Tale sonda, generalmente lunga 20-30 paia di basi, contiene un colorante fluorescente (*Reporter*) all'estremità 5' ed un colorante spegnitore (*Quencher*) all'estremità 3'. In condizioni di normale appaiamento sonda-DNA stampo, se il campione viene irradiato, l'energia fluorescente emessa dal colorante ad alta energia in 5' viene assorbita totalmente dal *quencher* a bassa energia. Fino a quando, in altri termini, la sonda resta intatta la vicinanza tra *reporter* fluorescente e *quencher* annulla l'emissione del segnale di fluorescenza perché si verifica un trasferimento di energia dal primo al secondo. Nel momento in cui la DNA-polimerasi, replicando lo stampo, incontra la sonda appaiata al suo interno, grazie alla sua attività esonucleasica 5' → 3', comincia a degradarla. L'allontanamento tra il *reporter* ed il *quencher* pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa in modo che il reporter inizi ad emettere fluorescenza. Quest'ultima incrementerà a ogni ciclo proporzionalmente al tasso di degradazione della sonda. L'accumularsi del prodotto amplificato viene rivelato monitorando quindi l'incremento di fluorescenza del *reporter*. Registrando la quantità di emissione fluorescente per ogni ciclo è possibile monitorare la reazione di polimerizzazione durante la sua fase esponenziale, nella quale il primo incremento significativo di prodotti neosintetizzati è collegato alla concentrazione iniziale di stampo nel campione. Infatti, maggiore è il numero di copie iniziali dell'acido nucleico, prima si osserverà un incremento significativo della fluorescenza. [111]

Nel nostro studio, per la genotipizzazione dei polimorfismi di singolo nucleotide, sono stati utilizzati specifici *primers* e *probes* preparati nel nostro laboratorio grazie a due programmi fondamentali consultabili in rete: "primer 3 program" e "Biosearch Technologies"; le sequenze sono state poi sintetizzate da "Eurogentec". I *probes*, specifici per le sequenze alleliche d'interesse, contenenti la mutazione di nostro interesse, risultano marcati in corrispondenza dell'estremità 5' con una sonda fluorescente (FAM o Texas Red a seconda della specifica variante allelica, mutata o wild-type) e con il "Black hole quencher" in corrispondenza dell'estremità 3'.

Per ciascuna reazione il DNA è stato usato in concentrazioni di 60 ng/μL.

Per la reazione di PCR è stato usato il "Rotorgene Q 5-Plex" (Qiagen). I genotipi sono stati valutati tramite il *software* Rotorgene, in grado di discriminare i segnali di fluorescenza specifici per ogni *probe*.

La determinazione dei genotipi specifici è stata confermata dall'analisi di sequenza tramite il sequenziatore in uso nel nostro laboratorio ("3130 genetic Analyzer", Applied Biosystem). Questi campioni di DNA sono stati utilizzati come controlli positivi nelle successive reazioni di real time PCR.

3.6. Analisi dell'espressione genica

L'analisi dell'espressione genica per l'IL28a e l'IL28b è stata fatta tramite real time PCR usando il sybergreen come agente intercalante.

Le prime RT-qPCR, usavano l'etidio bromuro (EtBr) come agente intercalante per individuare i prodotti di PCR che si accumulavano durante la reazione, mentre i sistemi attuali utilizzano il SybrGreen che si lega alla doppia strand di DNA, data la sua più alta sensibilità rispetto all'EtBr.

I requisiti per l'uso di questa sonda nella qPCR sono i seguenti: primo, non deve inibire la PCR, secondo, la sua fluorescenza cresce quanto più si lega alla doppia strand di DNA.

Durante il primo step di denaturazione, il SybrGreen è libero in soluzione emettendo solo segnali fluorescenti di background. Nella fase di annealing ed estensione, il SybrGreen, si lega ai prodotti di PCR appena formati ed emette fluorescenza sotto eccitazione della luce.

Nel secondo step di denaturazione, le molecole colorate vengono rilasciate nuovamente nella soluzione e la fluorescenza ritorna a livello di background.

Data la sua capacità a legarsi con qualsiasi DNA a doppio strand, il SybrGreen, consente l'individuazione di tutti i target semplicemente aggiungendola alla reazione di PCR.

Anche in questo caso i primers sono stati disegnati tramite gli appositi programmi indicati per la genotipizzazione e ordinati tramite Eurogentec.

L'analisi dell'espressione di questi geni include anche la determinazione dell'espressione della beta-actina come gene house keeping.

3.7. Analisi statistica

Per ciascun polimorfismo, i partecipanti sono stati raggruppati a seconda dell'allele trovato e le caratteristiche alla data del campione di sangue nei gruppi sono state confrontate usando il test del chi-quadrato (per variabili categoriche) e di Kruskal Wallis per il confronto delle mediane per variabili quantitative.

I partecipanti sono stati definiti come pazienti con risposta virologica precoce se avevano mostrato nella finestra temporale 3-4 mesi dopo l'inizio della terapia anti HCV almeno una rilevazione qualitativa negativa oppure un valore di carica virale inferiore alle 615 unità internazionali.

La risposta di lungo termine è stata invece basata sulle rilevazioni avvenute almeno 6 mesi dopo il termine della terapia. I partecipanti che hanno avuto una soppressione temporanea seguita da un incremento della carica virale >615 unità sono stati classificati come pazienti senza risposta.

La percentuale di pazienti con risposta precoce e risposta di lungo termine sono state calcolate e tabulate per ciascun polimorfismo a seconda degli alleli nei gruppi descritti.

Un modello di regressione logistica è stato utilizzato per stimare gli odds di risposta nei gruppi che sono stati confrontati fra loro tramite il calcolo degli odd ratio sia univariati che multivariati. In particolare, è stato elaborato un modello multivariato separato per ciascun polimorfismo dopo l'inclusione dei seguenti fattori misurati alla data del campione di sangue: genere (M,F), genotipo HCV, livello di viremia HCV pre-terapia, livello di viremia HIV pre-terapia, conta di CD4 pre-terapia, una variabile binaria indicativa di uso di cART al momento del campione di sangue e il peso.

Siccome i polimorfismi sono risultati altamente correlati fra loro, non è stato possibile selezionare tutti i polimorfismi per inclusione nel modello multivariato finale. Fra rs12979860 e rs12980275 è stato scelto in maniera arbitraria il secondo e rs760370 invece di rs11881222. È stato poi testato il valore predittivo dei 3 polimorfismi così selezionati attraverso un'analisi di Receiver Operating Characteristic (ROC). In particolare, sono stati considerati 3 modelli logistici annidati: il primo contenente il solo polimorfismo rs8099917, un secondo modello cui è stato aggiunto rs12980275 ed un terzo modello cui è stato aggiunto rs760370. Infine sono state calcolate le aree sotto la curva ROC corrispondenti a questi 3 modelli e testato l'incremento in superficie ottenuto dall'aggiunta dei vari polimorfismi. Questa analisi è stata condotta usando il package statistic STATA (versione 10).

Tutte le altre analisi statistiche sono state condotte usando il package statistico SAS (versione 9.2). Tutti i valori delle p-value dei vari tests sono corrispondenti a ipotesi nulle di tipo bilaterale.

Per l'analisi dell'espressione genica, invece, è stato utilizzato il software REST 2008 basato sulla metodologia Pfaffal.

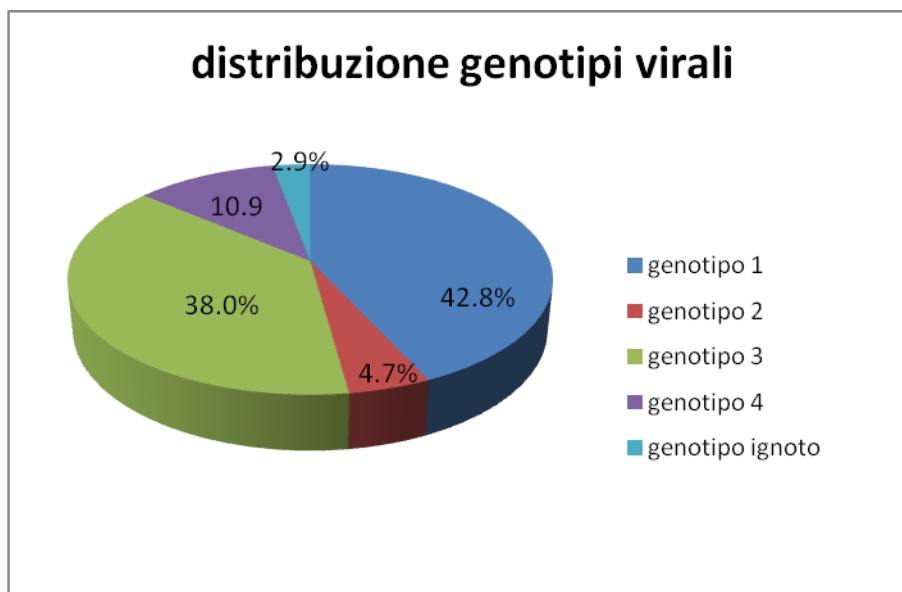
4. RISULTATI

4.1. Caratteristiche dei pazienti

Nel presente studio sono stati arruolati 320 pazienti, di cui 276 coinfezioni HCV-HIV che hanno intrapreso la terapia con Interferone pegilato (peg-interferone alfa-2a al dosaggio di 180 µg alla settimana per via sottocutanea oppure peginterferone alfa-2b alla dose di 1.5 µg/kg alla settimana per via sottocutanea) e Ribavirina (da 800 a 1200 mg al giorno per via orale) e hanno portato a termine la terapia secondo le indicazioni specifiche per il genotipo virale di HCV. Sono stati, inoltre, analizzati 44 soggetti con infezione da HIV, sierologia positiva per HCV ma HCV-RNA persistentemente negativo e che hanno, quindi, presentato clearance spontanea di HCV. Infine, sono stati inclusi nello studio 322 controlli sani.

I 44 pazienti che hanno eliminato spontaneamente il virus dell'HCV, provenivano tutti dall'ospedale L. Sacco, di questi 14 erano di sesso femminile (31.8%). Mentre dei 276 pazienti con infezione cronica, 80 provenivano dall'ospedale Sacco (29%), 59 dal progetto ICONA (21.4%) e 137 dall'ospedale San Raffaele (49.6%). Di questo gruppo, 63 erano di sesso femminile (22.8%). 118 (42.8%) erano infettati con genotipo 1 di HCV, 13 (4.7%) con genotipo 2, 105 (38.0%) con genotipo 3, 30 (10.9%) con genotipo 4 e 8 (2.9%) con genotipo sconosciuto o diverso dai precedenti.

Figura 4: distribuzione dei genotipi virali di HCV



Le principali caratteristiche dei pazienti con infezione cronica, sono mostrate nella tabella 1.

Di questi 276 pazienti che hanno intrapreso la terapia con Interferone pegilato e Ribavirina, 118 hanno raggiunto la Risposta Virologica Sostenuta (SVR), definita come negatività della presenza di HCV-RNA dopo 6 mesi dal termine della terapia specifica, 158 invece presentavano positività di HCV-RNA al termine della terapia e sono classificati come “Non-Responders” (NR).

Tabella 1: dati demografici dei pazienti ad inizio terapia

Caratteristiche pazienti con infezione cronica			
	Tot. =276	SVR=118	NR=158
Coorte, n(%)			
Sacco	80 (29.0%)	37 (31.35%)	43 (27.21%)
ICONA	59 (21.4%)	33 (27.97%)	26 (16.45%)
San Raffaele	137 (49.6%)	48 (40.68%)	89 (56.33%)
Sesso, n (%)			
Femmine	63 (23.0%)	28 (23.7%)	35 (22.2%)
Genotipo HCV, n(%)			
1	118 (42.0%)	27 (22.9%)	91 (57.6%)
2	13 (4.7%)	13 (11.0%)	0 (0%)
3	105 (38.0%)	71 (60.2%)	34 (21.5%)
4	30 (10.9%)	5 (4.2%)	25 (15.8%)
sconosciuto	8 (2.9%)	1 (0.8%)	7 (4.4%)
Carica virale HCV, log10 copies/mL			
mediana log10 (IQR)	5.94 (0.85, 7.64)	5.78 (0.85, 7.64)	5.98 (1.11, 7.53)
Carica virale HIV, copies/mL			
mediana log10 (IQR)	1.70 (0.00, 5.48)	1.70 (0.00,5.42)	1.70 (1.69, 5.48)
Terapia cART, n (%)			
sì	184 (67.2%)	67 (57.8%)	117 (74.1%)

In base ai genotipi di HCV la risposta alla terapia antivirale si è così distribuita: tra gli 118 pazienti (42.8%) con genotipo 1, 91 (77.12%) si sono dimostrati NR e 27 (22.88%) SVR; i 13 pazienti (4.7%) con genotipo 2 hanno tutti raggiunto la risposta virologica sostenuta; tra i 105

(38.0%) con genotipo 3, 34(32.38%) sono stati classificati come NR e 71(67.62%) come SVR.; per i 30 (10.9%) con genotipo 4, 25 (83.33%) sono stati classificati come NR e 5 (16.64%) come SVR; in ultimo ci sono 8 pazienti a genotipo ignoto, che sono risultati 7 (87.5%) NR e 1 (12.5%) SVR.

1.1. Genotipizzazione

Studi precedenti hanno mostrato che alcuni polimorfismi nella regione vicino al gene IL-28B sono associati alla mancata eliminazione dell'infezione da HCV in modo spontaneo. Questi sono fattori molto importanti nel predire la clearance spontanea del virus HCV in monoinfetti. Nonostante ulteriori studi siano necessari per chiarire i meccanismi funzionali che sottostanno all'associazione tra variazioni genetiche di IL28B e controllo dell'infezione da virus C, è ormai chiaro il ruolo dei polimorfismi a livello della regione intronica dello stesso gene. E' stato infatti visto che il genotipo CC in corrispondenza dello SNP ***rs12979860*** è associato in maniera assai significativa con la risposta virologica alla terapia combinata in pazienti con genotipo 1 così come con la *clearance* spontanea dell'infezione, e che l'allele minore G a livello degli SNPs ***rs8099917*** e ***rs12980275*** e ***rs11881222*** è significativamente associato con il cosiddetto "Null Virologic Response".

Dagli studi su ENT1, invece, è emerso che in pazienti con genotipo virale 1 o 4 trattati con PEG-INR e ribavirina, lo SNP ***rs760370*** potrebbe influenzare l'attività della ribavirina nella terapia anti-HCV. Il raggiungimento della risposta virologica rapida era maggiormente presente nei GG rispetto ai portatori AA/AG (50% vs 17% p=.007). Quindi questo potrebbe influenzare la risposta, modulando l'esposizione della ribavirina intracellulare negli epatociti.

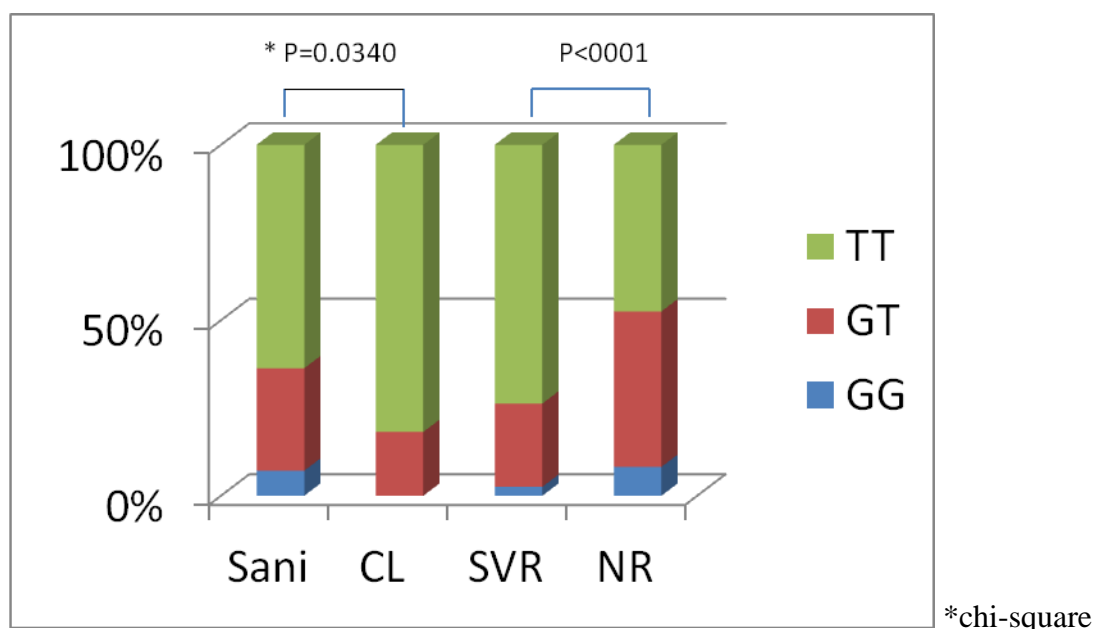
Tutti i pazienti arruolati e i controlli sani sono stati genotipizzati, mediante Real Time PCR, per i 5 polimorfismi presi in considerazione (***rs12979860***, ***rs8099917***, ***rs12980275*** e ***rs11881222*** per IL-28B e ***rs760370*** per SLC29A) in base al loro significato prognostico in riferimento al decorso della infezione da virus C, dopo estrazione di DNA. La genotipizzazione è stata eseguita in doppio, usando come standard campioni precedentemente sequenziati.

I risultati ottenuti hanno dimostrato una differenza significativa nella distribuzione dei genotipi nelle differenti classi di pazienti (NR, SVR, CL) e nei sani.

Per ogni polimorfismo è stata valutata la distribuzione allelica a seconda dei fenotipi di HCV.

SNP rs8099917: il genotipo GG non è stato riscontrato in nessuno dei pazienti che hanno dato clearance, mentre è presente in 13 (8,23%) dei pazienti NR, in 3 (2,54%) degli SVR e in 23 (7,14%) dei controlli sani. Il genotipo TT, è presente in 36 (81,82%) pazienti con clearance, in 87 (73,73%) pazienti SVR, in 75 (45,45%) NR e in 205 (56,01%) dei sani. In ultimo il genotipo GT è presente in 8 (2,19%) pazienti con clearance, in 28 (23,73%) SVR, in 70 (44,3%) NR e in 94 (29,19%) controlli sani. Si può notare come il genotipo TT sia legato alla clearance del virus sia nei pazienti che hanno eliminato il virus spontaneamente, che in quelli che invece hanno avuto risposta positiva alla terapia (fig. 5)

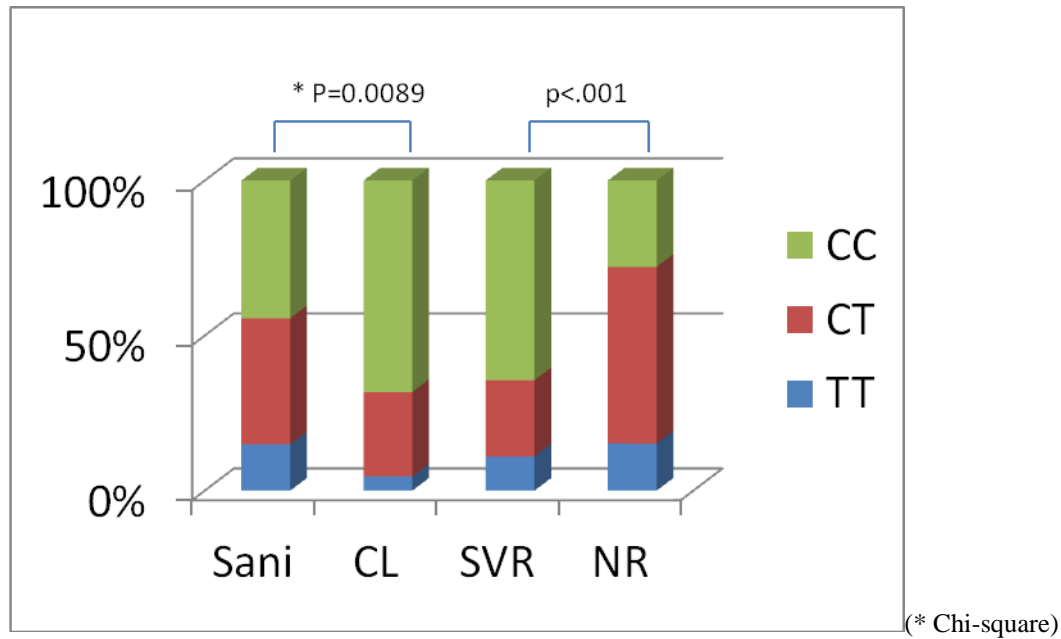
Figura 5: rs 8099917



SNP rs12979860: il genotipo CC è stato riscontrato in 30(68,18%) pazienti che hanno dato clearance, mentre è presente in 44 (27,85%) dei pazienti NR, in 76 (64,41%) degli SVR e in 143 (44,41%) dei sani. Il genotipo TT invece è presente in 2 (4,55%) dei pazienti con clearance, in 13 (11,02%) pazienti SVR, in 24 (15,19%) NR e in 48 (14,91%) dei controlli sani. Infine il genotipo TC è presente in 12 (27,27%) dei pazienti con clearance, in 29(24,58%) SVR, in 90 (56,96%) NR e in 131 (40,68%) dei sani.

Il genotipo CC è legato alla clearance, sia nei pazienti CL che in quelli SVR (fig. 6).

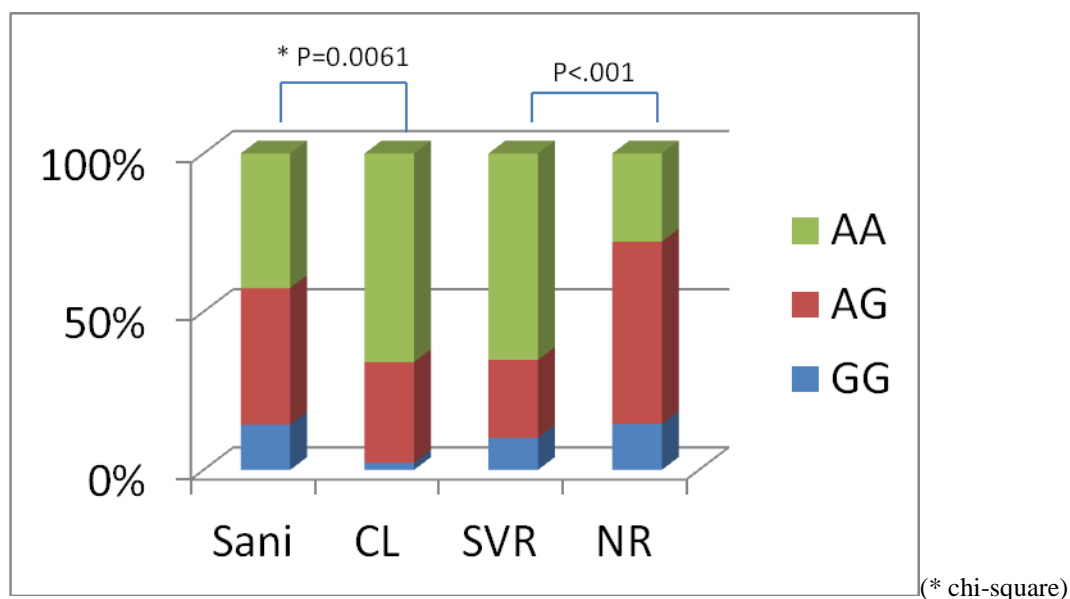
Figura 6: rs12979860



SNP rs12980275: il genotipo AA è stato riscontrato in 29 (65,91%) pazienti che hanno dato clearance, mentre è presente in 44 (27,85%) dei pazienti NR, in 77 (65,25%) degli SVR e in 137 (42,55%) dei sani. Il genotipo GG invece è presente in 1 (2,27%) dei pazienti con clearance, in 12 (10,17%) pazienti SVR, in (15,19%) NR e in 46 (14,29%) dei controlli sani. Infine il genotipo AG è presente in 14 (31,82%) dei pazienti con clearance, in 29(24,58%) SVR, in 91 (57,59%) NR e in 139 (43,17%) dei sani.

Il genotipo AA è legato ad una favorevole risposta al virus, anche in assenza di terapia (fig. 7).

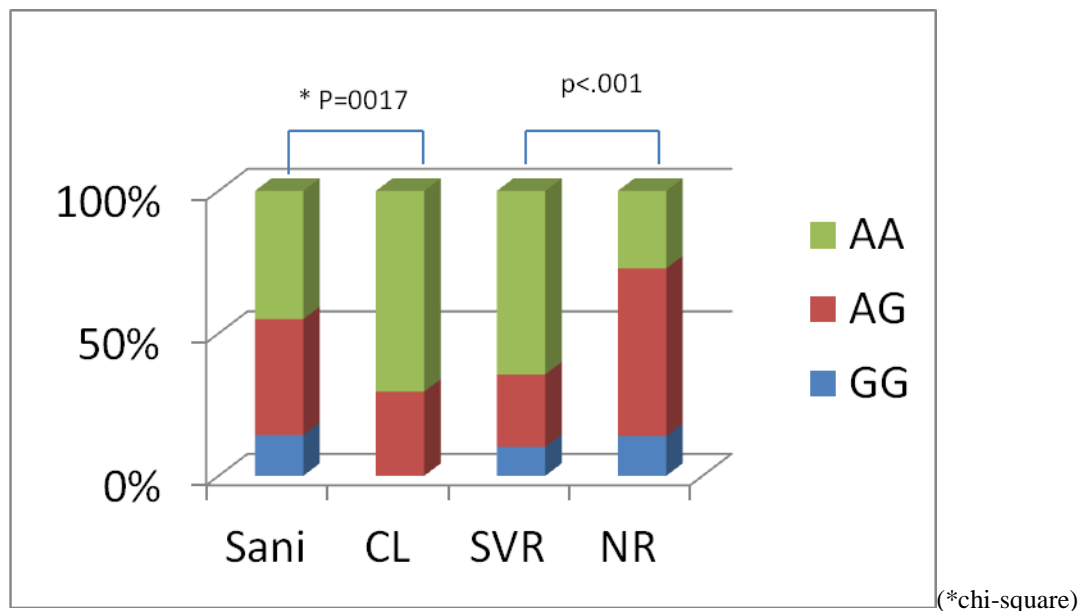
Figura 7: rs12980275



SNP rs11881222: il genotipo AA è stato riscontrato in 31 (70,45%) pazienti che hanno presentato clearance spontanea, mentre è presente in 43 (27,21%) dei pazienti NR, in 76 (64,41%) degli SVR e in 145 (45,03%) dei sani. Il genotipo GG invece è assente dei pazienti con clearance, in 12 (10,17%) pazienti SVR, in 22 (13,92%) NR e in 46 (14,29%) dei controlli sani. In ultimo il genotipo AG è presente in 13 (29,55%) dei pazienti con clearance, in 30 (25,42%) SVR, in 93 (58,86%) NR e in 131 (40,68%) dei sani.

Per questo polimorfismo invece, vediamo confermata la presenza del genotipo sfavorevole GG nei NR, in contrapposizione alla sua assenza nei pazienti con clearance spontanea (fig. 8).

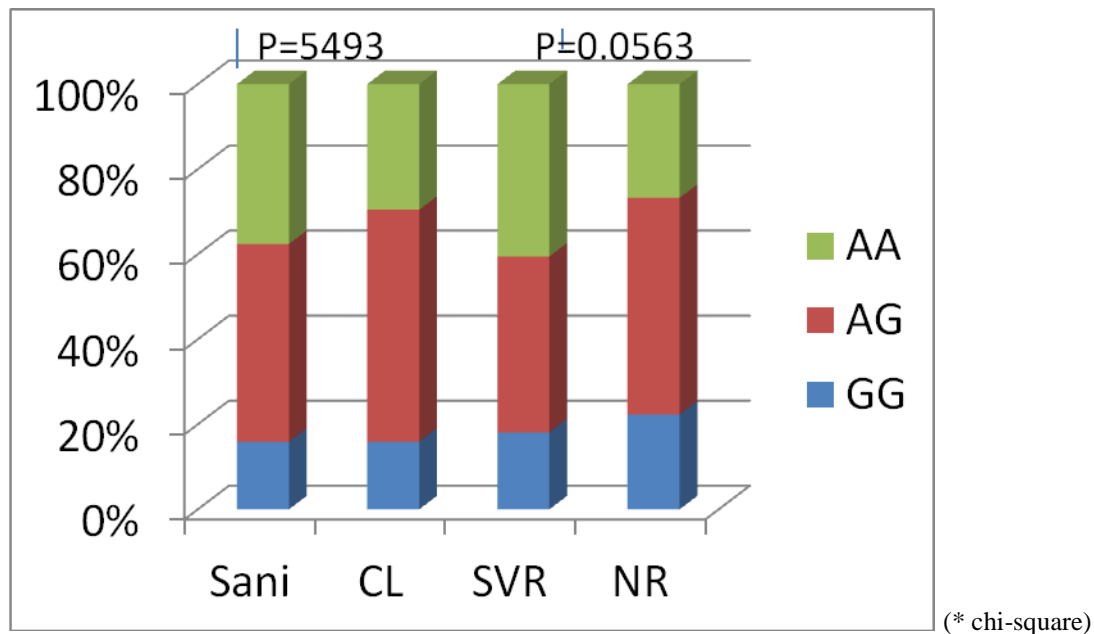
Figura 8: rs11881222



SNP rs760370: il genotipo AA è stato riscontrato in 13 (29,55%) pazienti con clearance spontanea, mentre è presente in 42 (26,75%) dei pazienti NR, in 47 (40,52%) degli SVR e in 121 (37,58%) dei sani. Il genotipo GG invece è presente in 7 (15,91%) con clearance, in 21 (18,1%) pazienti SVR, in 35 (22,29%) NR e in 51 (15,84%) dei controlli sani. In ultimo il genotipo AG è presente in 24 (54,55%) dei pazienti con clearance, in 48 (41,38%) SVR, in 80 (50,95%) NR e in 150 (46,58%) dei sani.

Il genotipo AA risulta maggiormente presente negli SVR rispetto agli NR (fig. 9).

Figura 9: rs760370



La distribuzione allelica dei 4 SNP del gene IL-28B e quella dello SNP nel gene SLC29A1 è quindi nettamente differente nei pazienti con clearance spontanea rispetto alla popolazione sana e ai pazienti con infezione cronica da HCV.

La tabella 2 mostra l'analisi statistica dei pazienti che hanno presentato clearance contro quelli con infezione cronica, indicando che la presenza dell'allele G nei polimorfismi rs8099917 ($p=0.00219$; O.R.=3,081; [1.451, 6.54]), rs12980275 ($p=0.00246$; O.R.=2.362; [1.336, 4.174]) e rs11881222 ($p=0,0001$; O.R.=3.661; [1.997, 6.779]) porterebbe ad una minore probabilità di eliminazione del virus.

Questo dato è anche confermato dal confronto tra sani e pazienti che hanno presentato clearance. Anche in questo caso si può notare siano legati alla minore probabilità di dare SVR.

Questi risultati mostrano come l'eliminazione del virus HCV e la cronicizzazione nei pazienti coinfecti potrebbe avere una base genetica e potrebbe dipendere da specifici alleli degli SNP presi in esame.

Tabella 2

ID SNP	Allele (Frequenza)	Cronici vs CL [C.I.]	CTRL vs CL [C.I.]
rs12979860	T (0,43)	p=0.00182 O.R.=2,42; [1.37-4.27]	p=0,00143 O.R.=2.45 [1.392-4.311]
rs8099917	G (0,22)	p=0.00219 OR.=3,081 [1.451-6,54]	p=0,00559 O.R.= 2,778 [1.311-5.884]
rs12980275	G (0,34)	p=0.00246 O.R.= 2.362 [1.336-4.174]	p=0,001 O.R.=2.517 [1.43-4.429]
rs11881222	G (0,35)	p=0,00001 O.R.=3,661 [1,997-6,779]	p=0,00019 O.R.=3,056 [1,659-5,629]

4.4. Analisi della risposta alla terapia anti-HCV.

Nel presente studio sono stati arruolati 276 pazienti coinfecti HCV-HIV che hanno intrapreso la terapia con Interferone pegilato e Ribavirina. Di questi, 158 non hanno risposto alla terapia (NR), mentre 118 hanno eliminato il virus dopo terapia (SVR).

Una prima analisi univariata ha mostrato come i pazienti con genotipo 2-3di HCV avevano una probabilità maggiore di rispondere alla terapia rispetto a quelli infettati con genotipo 1-4 (chi-square 70,9, $p<0,001$); carica virale di HIV superiore a log10 ($p=0.031$ O.R.= 1.29 [1.02, 1.63]) ha indicato una maggiore probabilità di eliminare il virus dopo terapia anti-HCV; mentre la somministrazione della terapia cART ($p=0,005$; O.R.=0.48 [0.29, 0.80]) indicherebbe una minore probabilità di eliminare il virus.

Si è visto che coloro che avevano l'allele G per i polimorfismi rs809917 (GT: $p<.001$; GG: $p=0.014$), rs12980275 (AG: $p<.001$; GG: $p=0.002$), rs11881222 (AG: $p<.001$; GG: $p=0.003$), rs760370 (AG: $p=0.014$; GG: $p=0.048$), e T per il polimorfismo rs12979860 (CT: $p<.001$; TT: $p=0.003$) hanno raggiunto lo stato SVR con minor probabilità.

Tabella 4

caratteristiche a inizio terapia	crude OR (95%)	p-value
sex		
Maschi	1.00	
Femmine	1.07 (0.61, 1.88)	0,815
HCV genotype		
1 o 4	1.00	
2 o 3	8.79 (5.05, 15.30)	<.001
sconosciuto	0.50 (0.06, 4.23)	0,527
HCV viral load Per log10 >	0.84 (0.60, 1.18)	0.316
HIV viral load per log10>	1.29 (1.02, 1.63)	0.031
CD4 count Per 100 cells/mm3	0.99 (0.89, 1.09)	0.819
cART therapy, n(%)		
no	1.00	
sì	0.48 (0.29, 0.80)	0.005
rs8099917		
TT	1.00	
GT	0.29 (0.17, 0.52)	<.001
GG	0.20 (0.05, 0.71)	0.014
rs12979860		
CC	1.00	
CT	0.18 (0.10, 0.32)	<.001
TT	0.31 (0.14, 0.66)	0.003
rs12980275		
AA	1.00	
AG	0.18 (0.10, 0.32)	<.001
GG	0.29 (0.13, 0.64)	0.002
rs11881222		
AA	1.00	
AG	0.18 (0.10, 0.31)	<.001
GG	0.30 (0.14, 0.67)	0.003
rs760370		
AA	1.00	
AG	0.51 (0.29, 0.87)	0,014
GG	0.51 (0.26, 0.99)	0,048

La variabili che hanno presentato un $p < .05$ nell'analisi univariata sono state incluse nella successiva analisi multivariata. E' stato elaborato un modello multivariato separato per ciascun polimorfismo dopo l'inclusione dei seguenti fattori: genere (M,F), genotipo HCV,

livello di viremia HCV pre-terapia, livello di viremia HIV pre-terapia, conta di CD4 pre-terapia, una variabile binaria indicativa di uso di cART al momento del campione di sangue e il peso.

Siccome i polimorfismi sono risultati altamente correlati fra loro, non e' stato possibile selezionare tutti i polimorfismi per inclusione nel modello multivariato finale. Fra rs12979860 e rs12980275 e' stato scelto in maniera arbitraria il secondo e rs760370 invece di rs11881222.

I dati ottenuti sono mostrati nella tabella 5, confermando che il genotipo virale 2 e 3 di HCV influenza positivamente la risposta alla terapia ($p < .001$; O.R.= 9.79 [5.44, 17.63]) e che l'allele G per i polimorfismi rs809917 (GT: $p = 0.001$; GG: $p = 0.012$), rs12980275 (AG: $p < .001$; GG: $p = 0.006$), rs11881222 (AG: $p < .001$; GG: $p = 0.010$), rs760370 (AG: $p = 0.018$; GG: $p = 0.048$), e T per il polimorfismo rs12979860 (CT: $p < .001$; TT: $p = 0.006$) hanno raggiunto lo stato SVR con minor probabilità.

Tabella 5

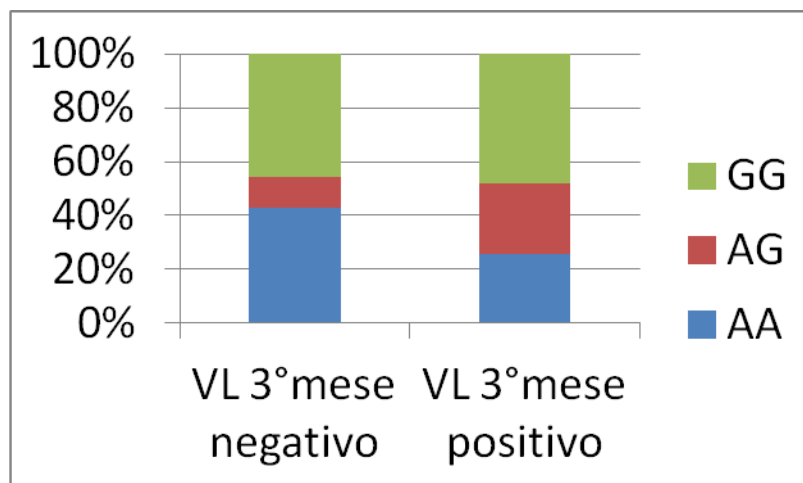
caratteristiche a inizio terapia	Adjusted OR (95%)	p-value
sex		
Maschi	1.00	
Femmine	0.91 (0.45,1.83)	0,796
HCV genotype		
1 o 4	1.00	
2 o 3	9.79 (5.44, 17.63)	<.001
unknown	0.32 (0.03, 3.00)	0,321
HCV viral load Per log10 >	1.05 (0.70, 1.56)	0,820
HIV viral load per log10 >	1.01 (0.70, 1.46)	0,965
CD4 count		
per 100 cells/mm3	0.94 (0.82, 1.06)	0,314
cART therapy, n(%)		
no	1.00	
si	0.69 (0.23, 2.08)	0,510
rs8099917		
TT	1.00	
GT	0.31 (0.15, 0.63)	0,001
GG	0.15 (0.03, 0.66)	0,012
rs12979860		
CC	1.00	
CT	0.14 (0.07, 0.29)	<.001
TT	0.26 (0.10, 0.68)	0.006
rs12980275		
AA	1.00	
AG	0.13 (0.07, 0.27)	<.001
GG	0.23 (0.08, 0.65)	0.006
rs11881222		
AA	1.00	
AG	0.13 (0.07, 0.27)	<.001
GG	0.27 (0.10, 0.74)	0.010
rs760370		
AA	1.00	
AG	0.46 (0.24, 0.87)	0,018
GG	0.51 (0.26, 0.99)	0,048

4.5. Risposta precoce

Lo SNP rs760370 di ENT1 ha presentato un'associazione significativa con lo stato di SVR; si è cercato di capire se può anche influenzare la cinetica della clearance del virus.

Sono stati considerati 209 pazienti di cui 115 presentavano carica virale di HCV negativa al terzo mese di terapia, mentre 93 carica virale positiva. Si è cercato di vedere se c'era associazione tra l'allele G e la risposta alla terapia (fig 10).

Figura 10



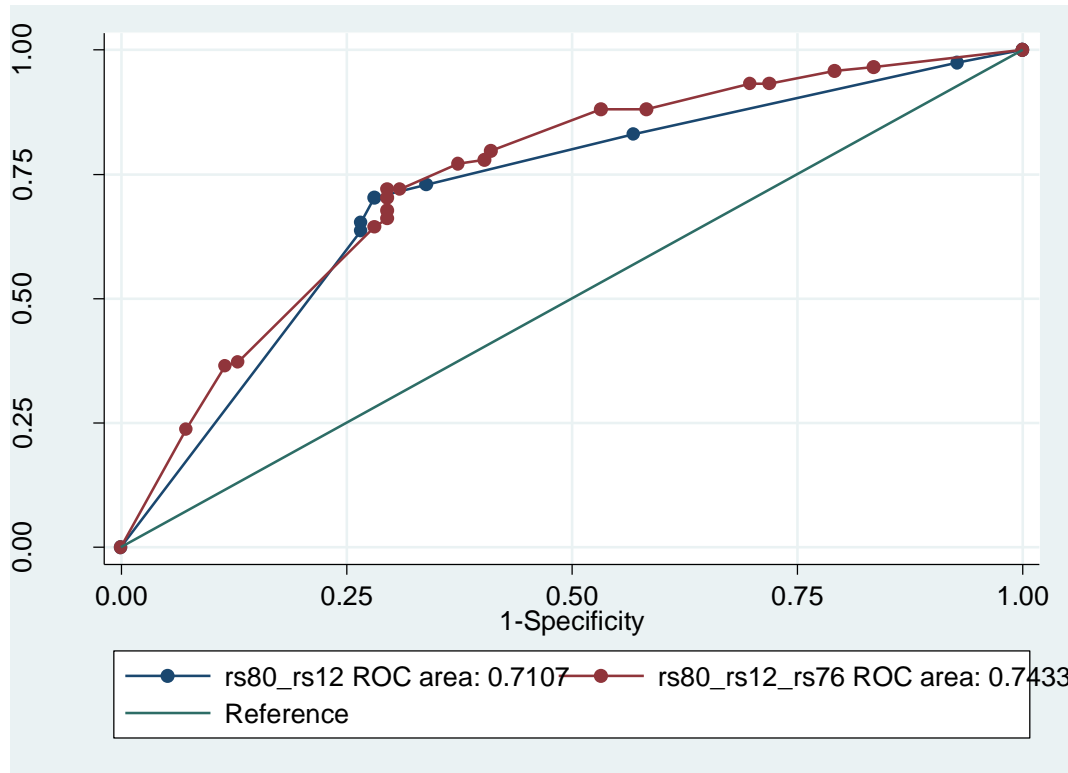
Se consideriamo i pazienti con risposta virologica rapida questi sono risultati: 29 con genotipo GG (25,22%), 53 con genotipo AG (46,09%) e 33 con genotipo AA (28,69%). Mentre quelli che presentavano carica virale positiva al secondo mese sono risultati: 13 con genotipo GG (13,98%), 44 con genotipo AG (47,31%) e 36 con genotipo AA (38,71%).

Il confronto fra questi due gruppi ha messo in evidenza la significatività dell'allele G, indicando che la presenza del genotipo GG è legata al fallimento terapeutico ($P=0.026$ O.R. 0.34, [0.13, 0.88]).

E' stato poi testato il valore predittivo dei polimorfismi selezionati (*rs8099917*, *rs12980275* e *rs760370*) attraverso un'analisi di Receiver Operating Characteristic (ROC). In particolare, sono stati considerati 3 modelli logistici annidati: il primo contenente il solo polimorfismo *rs8099917*, un secondo modello cui è stato aggiunto *rs12980275* ed un terzo modello cui è stato aggiunto *rs760370*. Infine sono state calcolate le aree sotto la curva ROC corrispondenti a questi 3 modelli e testato l'incremento in superficie ottenuto dall'aggiunta dei vari polimorfismi. In figura 11 l'ultima curva ottenuta. La maggiore area ottenuta indica una

maggiore specificità e sensibilità del test se si associano i tre polimorfismi presi in considerazione.

Figura 11



	obs	ROC Area	Std. Err.	-Asymptotic Normal- [95% Conf. Interval]	
rs80					
rs80_rs12	257	0.6401	0.0287	0.58389	0.69626
rs80_rs12	257	0.7107	0.0309	0.65013	0.77134
Ho: area(rs80) = area(rs80_rs12)					
chi2(1) = 13.00 Prob>chi2 = 0.0003					
. roccomp respyn rs80_rs12 rs80_rs12_rs76, graph summary					
	obs	ROC Area	Std. Err.	-Asymptotic Normal- [95% Conf. Interval]	
rs80_rs12	257	0.7107	0.0309	0.65013	0.77134
rs80_rs12~76	257	0.7433	0.0305	0.68346	0.80319
Ho: area(rs80_rs12) = area(rs80_rs12~76)					
chi2(1) = 4.18 Prob>chi2 = 0.0410					

4.6. Espressione dei geni IL28A e IL28B.

Partendo da pellet di PBMC in RNAprotect, è stata fatta l'estrazione dell'RNA di 22 pazienti coinfecti HIV-HCV (12 NR e 10 SVR), 10 pazienti con clearance spontanea e 38 controlli sani.

Questo RNA è stato poi retrotrascritto; il cDNA così ottenuto è stato utilizzato per PCR Real Time usando il sybergreen come agente intercalante.

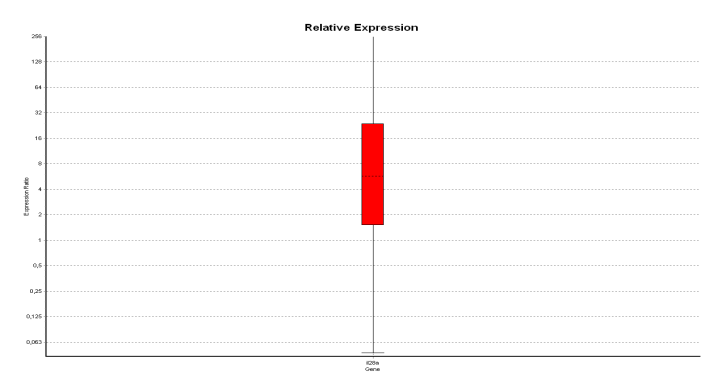
Per ogni paziente e controllo sano è stata fatta una PCR Real Time per il gene beta-actina, come gene house keeping, per IL-28A e per IL-28B. Ogni PCR è stata fatta in doppio.

È stata studiata l'espressione dei geni IL-28A e IL-28B nelle cellule mononucleate di sangue periferico di pazienti coinfecti HIV/HCV e nei controlli sani.

In primo luogo si è valutato se ci sono differenze nel livello di espressione tra i due diversi geni. Le analisi hanno dimostrato che il gene IL-28A, indipendentemente dal gruppo di studio, è espresso maggiormente rispetto al gene IL-28B ($p < .0001$).

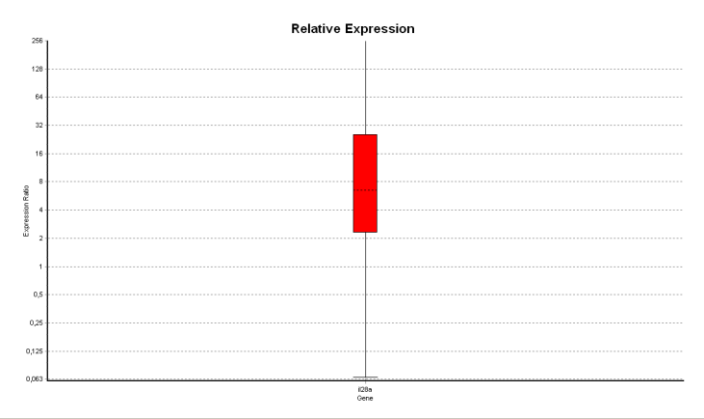
Andando a considerare i diversi gruppi di studio, nel gruppo sano, l'espressione di IL-28A è risultata in media 6,6 volte superiore (fig.12) rispetto all'IL-28B, mentre considerando tutti i pazienti coinfecti, si è trovata una differenza di 9 volte superiore. (fig.13).

Figura 12. Espressione di IL-28a rispetto a IL-28b nei controlli sani



Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
b-actin	REF	0,99	1				
il28a	TRG	0,99	6,607	0,858 - 51,688	0,184 - 538,911	0	UP

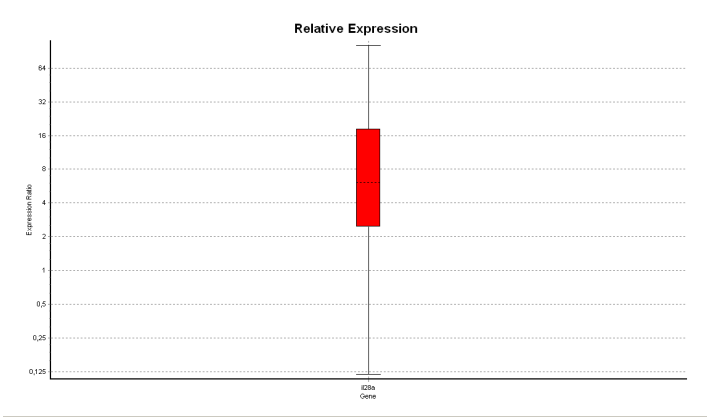
Figura 13. Espressione di IL-28a rispetto a IL-28b nei pazienti coinfecti HIV/HCV



		Reaction					P(H1)	Result
Gene	Type	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.			
b-actin	REF	0,99	1					
il28a	TRG	0,99	9,38	1,401 - 61,718	0,221 - 3.404,7990			UP

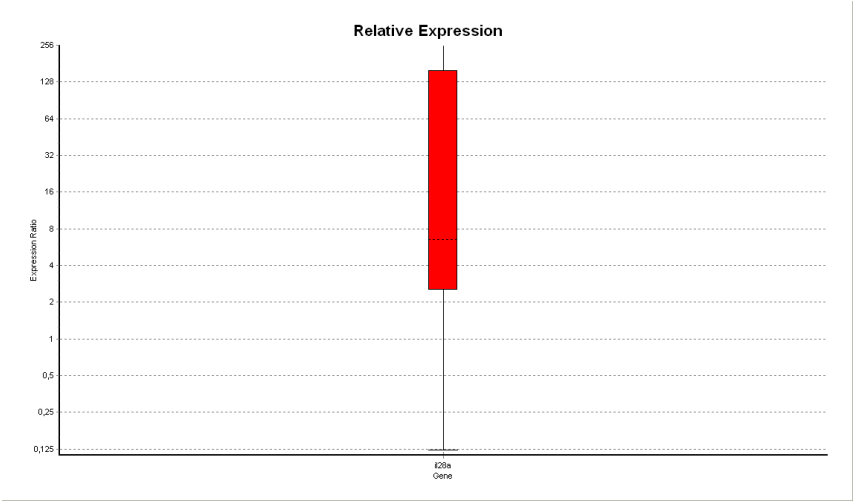
Il passo successivo è stato quello di analizzare l’espressione di IL-28A e IL-28B nei sottogruppi di pazienti coinfecti HIV-HCV. Anche in questo caso sono state trovate delle differenze significative. Si è visto infatti che l’espressione di IL-28a è in media 6 volte superiore a quella di IL-28b, nei pazienti che hanno spontaneamente eliminato il virus (fig. 14), ma è 20 volte più elevata nei pazienti che non hanno eliminato questo virus dopo la terapia (fig. 15).

Figura 14. Espressione di IL-28a rispetto a IL-28b nei pazienti coinfecti HCV/HIV che hanno presentato clearance spontanea di HCV.



Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
b-actin	REF	0,99	1				
il28a	TRG	0,99	5,814	1,312 - 22,781	0,254 - 85,969	0,004	UP

Figure 15. Espressione di IL-28a rispetto a IL-28b nei pazienti coinfecti HCV/HIV che non hanno eliminato il virus dopo terapia (NR).

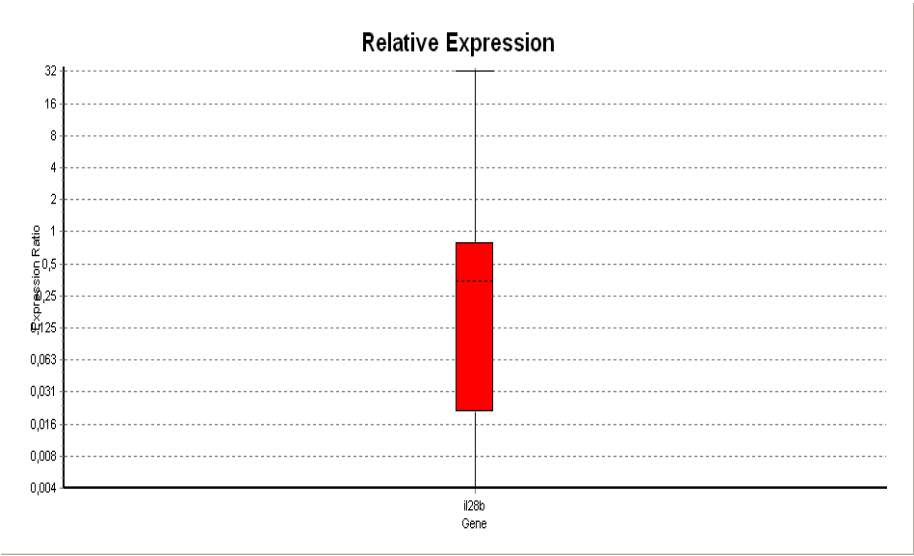


Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
b-actin	REF	0,99	1				
il28a	TRG	0,99	19,841	1,600 - 555,677	0,205 - 11.283,601	0,002	UP

Sebbene IL28a abbia, in genere, un livello di espressione maggiore rispetto a IL28b, questo non si è dimostrato significativo ai fini del nostro studio. Ulteriori analisi hanno mostrato che è invece IL28b a mostrare delle differenze nel livello di espressione tra i diversi gruppi di pazienti infetti.

Si è infatti visto che IL28b è espresso maggiormente ($p < 0,05$) nei pazienti che hanno eliminato il virus spontaneamente rispetto a quelli che hanno eliminato il virus dopo terapia (fig. 16).

Figure 16. Differenza di espressione di IL-28b tra SVR e NR



Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
b-actin	REF	0,99	1				
il28b	TRG	0,99	0	0,002 1,562	-0,000 7,799	-0,015	DOWN

Questi risultati indicano che il più alto livello di IL28a, rispetto a IL28b, nei NR rispetto agli altri gruppi di pazienti infetti ha una minore importanza se paragonati con i cambiamenti che ci sono nell’espressione di IL-28b.

Non ci sono altre differenze significative di IL-28b tra gli altri gruppi studiati, ma è importante notare che pazienti del gruppo SVR hanno il livello più alto di IL-28b rispetto ai NR, i quali a loro volta hanno un livello più basso rispetto ai controlli sani.

Quindi si può concludere che l’espressione di IL28b nei controlli sani è intermedia tra SVR (maggiore) e NR (minore).

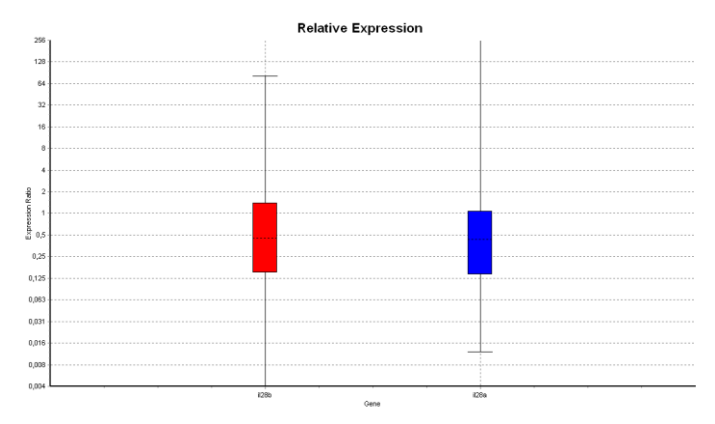
Clearance spontanea del virus HCV e la risposta alla terapia, si è visto essere geneticamente determinati dagli SNP trovati nella regione vicino alla sequenza codificante il gene IL28b.

Si è cercato di verificare se la minore espressione di IL28b, nei pazienti NR rispetto a chi ha eliminato l’HCV può essere determinato dallo stesso SNP. Nel gruppo di tutti i pazienti HCV positivi testati, indipendentemente dalla loro risposta all’infezione, si è trovato che coloro che hanno l’allele minore di rs8099917 (GT,GG) hanno livelli significativamente ($p<0,05$) inferiori di IL-28b, rispetto a coloro che hanno l’allele TT. (fig. 17)

Tuttavia, non si è osservato un tale effetto nel gruppo dei controlli sani, suggerendo che i genotipi analizzati non influenzano i livelli basali di IL-28b e che l’espressione di questa citochina di per sé non predice la risposta a potenziali infezioni da virus C (fig. 18).

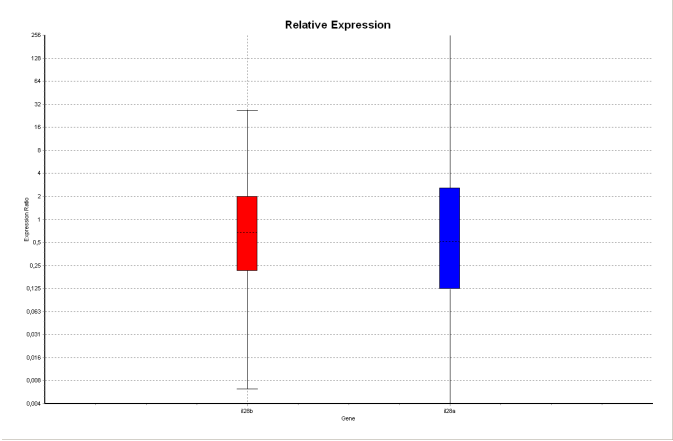
Sicuramente la presenza di specifici alleli dei genotipi testati può definire i livelli di IL-28b, però questi effetti possono essere manifesti solo durante l’infezione e quindi dipendono da fattori secondari che partecipano all’interazione tra ospite e virus.

Figure 17. Differenza di espressione di IL-28a e IL-28b tra pazienti coinfetti HCV/HIV con alleli differenti per lo SNP rs8099917.



Gene	Type	Reaction		Expression Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency					
b-actin	REF	0,99	1				
il28b	TRG	0,99	0,35	0,048 - 2,532	0,002 - 13,849	0,048	DOWN
il28a	TRG	0,99	0,53	0,084 - 2,210	0,021 - 360,711	0,213	

Figure 18. Differenza di espressione di IL-28a e IL-28b tra i controlli sani con alleli differenti per lo SNP rs8099917.



Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)
		Efficiency	Expression			
b-actin	REF	0,99	1			
il28b	TRG	0,99	0,632	0,125 - 3,341	0,021 - 9,466	0,273
il28a	TRG	0,99	0,627	0,060 - 5,546	0,010 - 205,235	0,44

5. DISCUSSIONE

Il virus dell'epatite C costituisce un problema sanitario mondiale di grande rilevanza ed è il responsabile principale di epatopatia cronica. L'epatite C è la causa principale di morte per patologia epatica e l'indicazione prevalente per il trapianto di fegato. Studi di storia naturale indicano che tra il 55% e l'85% dei soggetti che sviluppano un'epatite acuta C svilupperanno una epatopatia cronica. [9] [112]

Circa il 33% dei pazienti con infezione cronica da HCV progrediscono verso la cirrosi in un tempo mediano di 20 anni. I pazienti con cirrosi HCV-correlata corrono il rischio di sviluppare lo scompenso epatico e il carcinoma epatocellulare.

Il tasso di progressione a cirrosi aumenta con l'età, l'obesità, l'alcolismo, il sesso maschile e l'infezione da HIV. In Italia circa il 25-30% dei pazienti con infezione da HIV-1 sono coinfecti con HCV. [113]

Una meta-analisi ha mostrato che il tasso di progressione in cirrosi nei pazienti con HIV è circa 3 volte più rapido rispetto ai soggetti con singola infezione da HCV. [61]

Questa velocità di progressione è accelerata ulteriormente nei pazienti coinfecti con basse conte dei linfociti T CD4. [64] [67] [68] [69]

L'importanza e necessità di curare l'epatite C nelle persone con coinfezione sono maggiori che nei pazienti monoinfecti.

E' fondamentale che i pazienti con infezione da HIV-1 e HCV siano valutati per effettuare la terapia anti-HCV. [61]

Dall'avvento della terapia antiretrovirale, la patologia epatica è divenuta progressivamente una sempre maggiore causa di morbidità e mortalità nei pazienti con infezione da HIV-1. [56] [59]

L'infezione cronica da HCV, inoltre, complica il trattamento antiretrovirale determinando una frequenza più elevata di epatotossicità associata ai farmaci antiretrovirali. [61] [64]

Il trattamento efficace di HCV potrebbe migliorare la tollerabilità dei farmaci antiretrovirali riducendone il rischio di epatotossicità.

Diversi studi hanno dimostrato una prognosi ridotta nei pazienti con coinfezione HIV/HCV nell'era della terapia antiretrovirale combinata; tuttavia non è chiaro se HCV influenzi negativamente il decorso dell'infezione da HIV-1 o rifletta solamente l'impatto dell'utilizzo di droghe per via endovenosa che è fortemente legato all'infezione da HCV. [64]

E' anche tema di discussione se la terapia antiretrovirale sia in grado di migliorare la morbidità e la mortalità attribuibili all'infezione da HCV non trattata.

Il trattamento dell'epatite C, in particolare nei soggetti con infezione da HIV-1, è uno dei problemi più seri della medicina contemporanea.

Attualmente, per la terapia dell'epatite cronica da HCV si utilizza una combinazione di interferone α pegylato (PEG-IFN) e ribavirina per un periodo di 24-48 settimane; questo trattamento è approvato anche per la terapia dell'HCV nei pazienti con infezione da HIV-1. [78] [114]

Studi clinici in pazienti coinfecti con PEG-IFN e ribavirina per 48 settimane hanno mostrato tassi di risposta virologica sostenuta tra il 60% e il 70% per i genotipi di HCV 2 e 3, ma solamente del 15-18% per il genotipo 1. [61] Il trattamento anti-HCV è raccomandato secondo le linee guida standard ma con il suggerimento di trattare i pazienti con conta dei linfociti T CD4+ > 350/ μ l. Per i pazienti con conte dei linfociti T CD4 inferiori è preferibile iniziare la terapia antiretrovirale e dilazionare la terapia anti-HCV con lo scopo di ottenere un miglioramento della situazione immunologica prima di intraprendere la terapia con PEG-IFN e ribavirina. [61] [77]

In letteratura attualmente non ci sono dati sufficienti per porre indicazioni precise su quali pazienti possano effettuare il trattamento anti-HCV con beneficio e per quanto tempo la terapia stessa debba durare. Un altro ciclo di trattamento, inoltre, è attualmente proponibile a pazienti non responsivi al I ciclo. [78]

Data la significativa tossicità della terapia anti-HCV e i suoi costi elevati, si è sviluppato un interesse notevole nell'identificazione di fattori prognostici più efficaci per predire l'esito della terapia. I fattori predittivi finora identificati comprendono sia fattori dell'ospite che inerenti il virus.

Data la composizione genetica polimorfica delle popolazioni umane, le variazioni genetiche sono probabilmente coinvolte nella risposta alla terapia. [83]

Tre studi fondamentali di genome-wide association (WGAS) pubblicati nel 2009 hanno identificato il ruolo cruciale del gene IL-28B nella patogenesi dell'infezione da HCV. Alcuni polimorfismi situati nel gene o in prossimità di esso non solo sono stati in grado di predire la risposta virologica sostenuta, ma hanno consentito di spiegare le differenze nei tassi di risposta tra caucasici e afro-americani alla terapia standard con PEG-IFN e ribavirina.

Nel presente studio si è analizzato il ruolo dei polimorfismi rs8099917, rs12979860, rs12980275 e rs11881222 per il gene IL-28B e rs760370 per il gene SLC29A, nella risposta

alla terapia standard contro HCV, nei pazienti con coinfezione da HIV e nella clearance spontanea di HCV nella stessa tipologia di pazienti.

I risultati del nostro studio hanno dimostrato che l'allele wild type T del polimorfismo rs12979860 è associato alla mancata risposta al trattamento standard contro HCV nei pazienti coinfecti HIV/HCV rispetto al genotipo mutato CC e similmente l'allele T è significativamente meno rappresentato nei pazienti con clearance spontanea di HCV. Questo dato conferma i diversi studi connessi ad una più alta probabilità di clearance virale [88] e di Risposta Virologica Sostenuta alla terapia combinata [87] del genotipo CC rispetto all'allele e al genotipo wild-type (T e T/T) nei pazienti con singola infezione da HCV.

Analogamente, per quanto riguarda i polimorfismi rs8099917, rs12980275 e rs11881222 dal nostro studio emerge che la presenza dell'allele mutato G è associata alla mancanza di risposta virologica al trattamento rispetto al genotipo wild type TT. Anche questo dato si allinea con i dati pubblicati che mostrano che l'allele mutato (G) e la mutazione in omozigosi (G/G) sembrerebbero predittivi di Non Risposta Virologica al trattamento nei pazienti con singola infezione. [89] [90] [91]

I nostri dati suggeriscono che le variazioni genetiche di IL-28B influenzano la risposta alla terapia anti-HCV anche nei pazienti con coinfezione da HIV e HCV

I pazienti con genotipo 2-3 di HCV hanno mostrato una probabilità maggiore di rispondere alla terapia rispetto a quelli infettati con genotipo 1-4 (chi-2 70,9, $p < 0,001$); carica virale di HIV ($p = 0,031$ O.R. = 1.29 [1.02, 1.63]) ha indicato una maggiore probabilità di eliminare il virus dopo terapia anti-HCV; mentre la somministrazione della terapia cART ($p = 0,005$; O.R. = 0.48 [0.29, 0.80]) indicherebbe una minore probabilità di eliminare il virus.

Il polimorfismo rs760370 che codifica per ENT1, proteina coinvolta nel trasporto della ribavirina ha messo in evidenza la significatività dell'allele G, nel confronto tra pazienti che dopo tre mesi hanno carica virale di HCV negativa, rispetto a quelli con carica positiva, indicando che la presenza del genotipo GG è legata al fallimento terapeutico ($P = 0,026$ O.R. 0.34, [0.13, 0.88])

L'analisi dell'espressione genica di IL28B e IL28A ha dimostrato che IL28A è in generale espresso con un valore più alto rispetto a IL28B, in tutti i gruppi testati. Tuttavia, si è visto che IL28B è inibito nei pazienti che non rispondono alla terapia, rispetto a quelli che danno SVR. Inoltre l'espressione di IL28B è più alta nei pazienti HCV che presentano gli alleli

favorevoli alla clearance e alla risposta alla terapia. Questo risultato però non è confermato nei sani, andando a dimostrare che i diversi livelli di espressione sono il risultato di cause secondarie dovute probabilmente alla presenza del virus.

Il ruolo preciso dei polimorfismi di IL28B non è al momento chiaro. I polimorfismi sono in linkage disequilibrium, almeno nei caucasici, e sono localizzati a monte del gene IL-28B; questa localizzazione suggerisce che questi SNPs abbiano un ruolo nella regolazione trascrizionale del gene IL-28B di cui influenzano dunque l'espressione, di conseguenza influenzando la risposta alla terapia. Dati funzionali suggeriscono che rs8099917 è associato a differenze in IL-28B, con l'allele protettivo che determina un' aumentata espressione di mRNA negli individui sani. [90]

In uno studio recente, Honda et al. hanno evidenziato che in pazienti con epatite cronica C, il genotipo non-responsivo dello SNP rs8099917 era associato ad una più elevata espressione di interferon-stimulated genes (ISGs) nel fegato prima dell'inizio della terapia anti-HCV. [115] Dati analoghi sono stati riportati da Abe et al. [116] E' interessante notare che un'alta induzione di ISGs prima del trattamento è stata in precedenza correlata di per sé con lenta risposta o mancata risposta alla terapia basata su IFN- α . [117] [118]

I nuovi lavori suggeriscono che l'induzione di ISGs si differenzia a seconda dell'aplotipo di IL28B, un dato che è ulteriormente confermato dall'osservazione che la correlazione tra livelli di mRNA di IL28B e ISGs presenta una slope più ripida nel genotipo non-responsivo. [115] Questi dati forniscono informazioni nuove e rilevanti sulla patogenesi dell'infezione da HCV nel paziente coinfecto e molto probabilmente permetteranno un salto qualitativo notevole della cura della stessa infezione nel prossimo futuro. I nostri dati confermano nel paziente coinfecto i risultati di quattro studi GWAS sui pazienti monoinfetti, confermando che l'associazione è rilevante e riproducibile. In secondo luogo, benché sia già stato dimostrato in precedenza che IFN- λ ha proprietà anti-HCV, l'osservazione da parte di diversi studi, incluso il presente, che polimorfismi in questa regione influenzano l'esito sia dell'infezione iniziale che della terapia è altamente innovativo. La forza di questa associazione in diversi gruppi etnici e la sua indipendenza da variabili pretrattamento ha cambiato radicalmente la nostra comprensione della patogenesi di HCV e ha spostato il focus della ricerca sull'immunità innata.

La domanda fondamentale ora è come queste scoperte influenzeranno la pratica clinica.

Nel contesto della farmaco genomica, la genotipizzazione di IL28B potrebbe condurre ad un passo innovativo nella terapia anti-HCV: la personalizzazione della terapia; si potranno identificare i pazienti in grado di rispondere positivamente al trattamento. Al contrario,

pazienti con un fenotipo non responsivo, in particolare se in presenza di modesto danno epatico, potranno ottenere un posponimento della terapia finchè farmaci nuovi e con diretta attività antivirale saranno disponibili e, nello specifico, nei pazienti coinfecti con basse conte dei linfociti T CD4+ si potrà attendere anche il recupero immunologico per incrementare il successo della terapia. In maniera analoga pazienti con un genotipo sfavorevole e che hanno un'epatopatia rapidamente progressiva potrebbero essere indirizzati precocemente verso il trapianto di fegato, dato che la loro probabilità di risposta alla terapia è scarsa e la progressione nei pazienti coinfecti è più rapida.

D'altronde se un paziente ha un genotipo favorevole, questa informazione potrà essere utilizzata per incoraggiare il paziente a considerare una terapia antivirale precoce. Nonostante questi benefici evidenti, è importante sottolineare che i polimorfismi di IL-28B non spiegano tutti i fallimenti terapeutici e che i pazienti con genotipo non-responder potrebbero comunque rispondere alla terapia.

Studi futuri valuteranno la cinetica di risposta e indagheranno se i pazienti con genotipo responder potranno utilizzare un ciclo di terapia abbreviato come già avviene nella pratica clinica per i pazienti con infezione da genotipi 2 e 3. A questo proposito, lo studio di Thompson et al suggerisce già che gli SNPs favorevoli di IL28B sono associati ad una probabilità più alta per una risposta alla terapia antivirale rapida (4 settimane) ed ultrarapida (2 settimane). [119] Queste ipotesi applicative si tradurranno rapidamente in una migliore cura dei pazienti e in una migliore selezione dei pazienti per il trattamento, determinando anche una riduzione dei costi della sanità correlati all'infezione da HCV.

Le informazioni ottenute sul ruolo di IL28B nell'infezione da HCV potranno permettere lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici come, ad esempio, analoghi di IL28B. [120] Gli analoghi potrebbero essere utilizzati per potenziare la terapia antivirale standard, ma anche sostituire l'IFN- α . E' importante segnalare che una forma pegylata di IL29, un altro membro della famiglia degli IFN- λ , è attualmente in fase di studio in studi clinici [121] [122] In vitro, IL29 mostra attività antivirale anti-HCV simile all'IFN- α [121] [123], con il secondo che possiede una efficacia lievemente migliore a dosi più basse.

Lo studio dei polimorfismi a carico di IL28B è assai promettente soprattutto nella valutazione clinica del paziente con epatite cronica per decidere se iniziare o meno il trattamento con interferone e ribavirina. Potrebbe inoltre essere utile nel definire dei regimi terapeutici individualizzati rispetto alla durata della terapia combinata. [149]

Infine il ruolo fondamentale di IL28B nel controllo dell'infezione ha aperto nuovi orizzonti riguardo la possibilità di utilizzare l'IFN-lambda come agente terapeutico in pazienti HCV positivi.

Bibliografia

- [1] Myron J, Tong PhD et al - Clinical outcome after transfusion-associated hepatitis C - The New England Journal of Medicine 1995;322:1463-66.
- [2] Houghton m. Hepatitis C. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanok RH, eds. Fields Virology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996; 1035-1058.
- [3] Strader DB, Seeff LB. Hepatitis C: A brief clinical overview. ILAR 2001; 42:107-116.
- [4] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989; 244: 359-36.
- [5] Simmonds P, Holmes EC, Cha TA et al. classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. J. Gen. Virol 1993; 74: 2391-2399.
- [6] Han JH, Shyamala V, Richman KH et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991; 88:1711-1715.
- [7] Trowbridge R, Gowans EJ. Identification of novel sequences at the 5' terminus of the hepatitis c virus genome. J viral Hepatitis 1998; 5: 95-98.
- [8] Lauer, Walker - Hepatitis C virus infection - The New England Journal of Medicine, 2001 July 5;345(1):41-52
- [9] Jay H. Hoofnagle - Course and out come of Hepatitis C - Hepatology 2002;36:S21-S29
- [10] Vrieliak H, van der Poel CL et al - Look.back study of infectivity of anti-HCV ELISA-positive blood components - Lancet 1995;345:95-96
- [11] Esteban JI, Lopez Tapavera JC et al - High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus – Annals of Internal Medicine 1991;115:443-49
- [12] George B, Schreiber DSc - The risk of transfusion-transmitted viral infections – The New England Journal of Medicine 1996;334(26):1685-90
- [13] Harrison's Principles of Internal Medicine 17th Edition.
- [14] Girardi E, Zaccarelli M et al - Hepatitis C virus infection in intravenous drug users: prevalence and risk factors - Scandinavian Journal of Infectious Diseases 1990;22:751-52
- [15] Bell J, Batey RG et al - Hepatitis C virus in intravenous drug users - The Medical Journal of Australia, 1990;153:274-76
- [16] Ridzon R, Gallagher K et al - Simultaneous transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus from a needle-stick injury - New England Journal of Medicine 1997;336:919-922
- [17] Puro V, Petrosillo N et al - Occupational hepatitis C virus infection in Italian health care workers - American Journal of Public Health 1995;85:1272-1275
- [18] Mauro Moroni, Roberto Esposito, Fausto De Lalla – Malattie Infettive – 7° edizione
- [19] Eyster ME, Alter HJ et al - Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) - Ann Intern Med 1991;115:764-768
- [20] Kamel MA, Ghaffar YA et al - High HCV prevalence in Egyptian blood donors— Lancet 1992;340:427
- [21] Noguchi S, Sata M et al - Routes of transmission of hepatitis C virus in an endemic rural area of Japan: molecular epidemiologic study of hepatitis C virus infection - Scandinavian Journal of Infectious Diseases 1997;29:23-28
- [22] Chiaramonte M, Stroffolini T et al - Risk factors in community-acquired chronic hepatitis C virus infection: a case control study in Italy - Journal of Hepatology 1996;24:129-34
- [23] Prati D, Capelli C et al - The incidence and risk factors of community-acquired hepatitis C in a cohort of Italian blood donors - Hepatology 1997;25:702-704
- [24] Gail V Matthews and Gregory J Dore - HIV and hepatitis C coinfection – Journal of gastroenterology and hepatology, 2008 July;23(7 Pt 1):1000-8.
- [25] Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. Hepatology 1997; 26: 15S-20.

- [26] Johannes Wiegand¹, Katja Deterding et al - Treatment of acute hepatitis C: the success of monotherapy with (pegylated) interferon a - *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008;62:860–865
- [27] 57. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM et al - The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral and environmental factors - *JAMA*, 2000;284:450-456.
- [28] 54. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR et al - Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus - *The Journal of Experimental Medicine*, 2000;191:1499-1512.
- [29] Alberti A, Morsica G, Chemello L et al. Hepatitis C viremia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 1992; 340: 697-698.
- [30] Vaquer P, Canet R, Llompart A et al. Histological evolution of chronic hepatitis C. Factors related to progression. *Liver* 1994; 14:265-269.
- [31] Benvegna¹ L, Pontisso P, Cavalletto D et al. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997; 25:211-215.
- [32] Honda M, Kaneko S, Sakai A et al. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 1994; 20: 1144-51.
- [33] Karin Neukam¹, Juan Macías², José A Mira et al - A review of current anti-HCV treatment regimens and possible future strategies - *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2009;10(3):417-433
- [34] Norio Hayashi and Tetsuo Takehara - Antiviral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future – *Journal of Gastroenterology*, 2006 Jan;41(1):17-27
- [35] Chronic Hepatitis C: Current Disease Management - National Institutes of Health (NIH) Bethesda., 2006 . Available from: www.health.nih.gov/topic/HepatitisC
- [36]. Dienstag JL, McHutchison JG - American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C - *Gastroenterology* , 2006 Jan ;130(1):231 -64
- [37] Andrew Aronsohn and Nancy Reau – Long-term outcomes after treatment with interferon and ribavirin in HCV patients - *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2009 Aug;43(7):661-71.
- [38] Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK et al - Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients - *The New England Journal of Medicine*, 2004 July 29;351(5):438–450.
- [39] Romero-Gomez M, Fernandez-Rodriguez CM, Andrade RJ et al - Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C – *Journal of Hepatology*, 2008;48:721–727.
- [40] Bruchfeld A, Lindahl K, Stahle L et al - Interferon and ribavirin treatment in patients with hepatitis C-associated renal disease and renal insufficiency - *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 2003;18:1573–1580.
- [41]. Graham CS, Baden LR, Yu E et al - Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis - *Clinical Infectious Disease*, 2001;33:562–569.
- [42] Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK et al - Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients - *The New England Journal of Medicine*, 2004 Jul 29;351(5):438-50.
- [43] Muir AJ, Bornstein JD, Killenberg PG - Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites - *The New England Journal of Medicine* 2004 May 27;350(22):2265-71
- [44] Conjeevaram HS, Fried MW, Jeffers LJ et al - Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1 - *Gastroenterology*, 2006;131:470–477.
- [45] Shiffman ML, Mihás AA, Millwala F et al - Treatment of chronic hepatitis C virus in African Americans with genotypes 2 and 3 – *The American Journal of Gastroenterology*, 2007;102:761–766.
- [46] Davis GL, Wong JB, McHutchison JG et al - Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C – *Hepatology*, 2003;38:645–652.
- [47]. Marcellin P, Jensen D, Hadziyannis J et al - Differentiation of early virologic response (EVR) into RVR, complete EVR (cEVR) and partial EVR (pEVR) allows for a more precise prediction of SVR in HCV genotype 1 patients treated with peginterferon alfa-2a (40 kD) (PEGASYs) and ribavirin – 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), November 2-6 2007, Boston .
- [48] Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P et al - Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kD)/ribavirin therapy – *Hepatology*, 2006;43:954–960.
- [49] Drusano GL, Preston SL - A 48-week duration of therapy with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin may be too short to maximize long-term response among patients infected with genotype-1 hepatitis C virus – *Journal of Infectious Disease*, 2004;189:964 -70

- [50] Berg T, von Wagner M, Nasser S et al - Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin -Gastroenterology 2006;130:1086-97
- [51] Dodig M, Tavill AS. Hepatitis C and human immunodeficiency virus: clinical issues in coinfections. J Clin. Gastroenterol. 2001; 33: 367-374.
- [52] Hagan H, Des Jarlais DC. Hiv and HCV infection among injecting drug users. Mount Sinai J Med 2000; 67: 423-428.
- [53] Bica I, McGovern B, Dhar R et al. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. Clin. Infect. Dis. 2001; 32: 492-7.
- [54] Puoti M, Gargulio F, Roldan EQ et al. Liver damage and kinetics of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus replication during the early phases of combination of antiretroviral treatment. J. Infect. Dis. 2000; 181: 2033-2036.
- [55] Benhamou Y, di Martino V, Bochet M et al. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients: impact of protease inhibitor therapy. Hepatology 2001; 34: 283-7.
- [56] Jenny O. Smith, MD, and Richard K. Sterling, MD - Hepatitis C and HIV - Current Gastroenterology Reports 2007;9:83-90
- [57] Sulkowski MS, Thomas DL - Hepatitis C in the HIV-infected person - Annals of Internal Medicine 2003;138:197-207.
- [58] David L. Thomas - The Challenge of Hepatitis C in the HIV-Infected Person - The Annual Review of Medicine, 2008;59:473-85
- [59] Bica I, McGovern B, Dhar R et al - Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection - Clinical Infectious Diseases, 2001;2:492-97.
- [60] Sherman KE, Rouster SD, Chung RT, Rajicic N. Hepatitis C virus Prevalence among patients infected with human immunodeficiency virus; a cross section analysis of the US adult AIDS clinical trials group. Clin. Infect. Dis. 2002; 34: 831-837.
- [61] M. S. Sulkowski and Y. Benhamou - Therapeutic issues in HIV/HCV-coinfecting patients – Journal of Viral Hepatitis, 2007;14:371-86
- [62] Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML et al - Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma – The Journal of general virology, 1997;78(7):1521-1525.
- [63] Graham CS, Baden LR, Yu E et al - Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis - Clinical Infectious Diseases, 2001;33:562-569.
- [64] Gail V Matthews and Gregory J Dore - HIV and hepatitis C coinfection – Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2008;23:1000-1008
- [65] Cribier B, Rey D, Schmitt C et al - High hepatitis C viraemia and impaired antibody response in patients coinfecting with HIV-AIDS, 1995;9:1131-6.
- [66] Polis CB, Shah SN, Johnson KE et al - Impact of maternal HIV coinfection on the vertical transmission of hepatitis C virus: a meta-analysis. Clinical Infectious Diseases, 2007;44:1123-31.
- [67] Benhamou Y, Bochet M et al - Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group – Hepatology, 1999;30(4):1054-8.
- [68] Mohsen AH, Easterbrook PJ, Taylor C et al - Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients – Gut, 2003;52:1035-40.
- [69] J.E. Arends, C.A.B. Boucher, A.I.M. Hoepelman - Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus coinfection: where do we stand? - The Netherlands journal of medicine, 2005 May;63(5):156-63
- [70] Lo Re V 3rd, Kostman JR, Amorosa VK, - Management Complexities of HIV/HCV Coinfection in the Twenty-First Century – Clinics in Liver Disease, 2008 August;12(3):587
- [71] Puoti M, Bruno R, Soriano V et al - Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome – AIDS, 2004;18(17):2285-2293.
- [72] Quirishi N, Kreuzberg C, Luchters G et al - Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection – Lancet, 2003;362:1708-13.
- [73] Marine-Barjoan E, Saint-Paul MC, Pradier C et al - Impact of antiretroviral treatment on progression of hepatic fibrosis in HIV/hepatitis C virus coinfecting patients – AIDS, 2004;18:2163-70.
- [74] Sulkowski MS, Moore RD, Mehta SH et al - Hepatitis C and progression of HIV disease – JAMA, 2002;288:199-206.
- [75] Anderson KB, Guest JL, Rimland D - Hepatitis C virus coinfection increases mortality in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era: data from the HIV Atlanta VA Cohort Study –Clinical Infectious Diseases, 2004;39:1507-13.

- [76] Sterling R, Lissen E, Clumeck N et al - Can routine non-invasive tests predict liver histology in HIV/HCV co-infection? Analysis of patients entering the AIDS PEGASYS Ribavirin International Co-infection Trial (APRICOT) - Proceedings of the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, MA. February 22–25, 2005. Available at: <http://www.retroconference.org/2005/>
- [77] Mark Sulkowsky - Viral Hepatitis and HIV infection - *Journal of Hepatology* 2008;48:353-67
- [78] Ravinder Dhillon, Simona Rossi, Steven K Herrine - Pegylated interferon 2a and 2b in combination with ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in HIV infected patients - *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2008;4(4) 789–796
- [79] Pol S, Soriano V - Management of chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients - *Clinical Infectious diseases*, 2008 Jul 1;47(1):94-101.
- [80] Angela J. Frodsham and Adrian V.S. Hill - Genetics of infectious diseases - *Human Molecular Genetics*, 2004;13(2):187-94
- [81] Shelley Segal and Adrian V.S. Hill - Genetics susceptibility to infectious disease - *Trends in Microbiology*, 2003 September;11(9):445-48
- [82] Jenefer. M. Blackwell, Sarra E. Jamieson, David Burgner - HLA and Infectious diseases - *Clinical Microbiology Reviews*, 2009 April;22(2):370-85
- [83] LJ Yee - Host Genetic Determinants in hepatitis C virus infection - *Genes and Immunity*, 2004;5:237-245
- [84] LJ Yee, K Im, H Yang, TJ Liang - Interleukin-6 haplotypes and the response to therapy of chronic hepatitis C virus infection - *Genes and Immunity*, 2009;10:365-372.
- [85] Mingcai Li, Xiaojin Liu, Yanchun Zohu and Shao Bo Su - Interferon- λ s: the modulators of antiviral, antitumor and immune responses - *Journal of Leukocyte Biology*, 2009 July;86(1):23-32.
- [86] Fate Abera, Nuzhat A.Ahmad - Genetic variation in interleukin-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance in genotype 1 patients: the dawn of a new era? - *Selected summaries – Gastroenterology*, 2010;138:2546-2554
- [87] Ge D, Fellay J, Thompson AJ et al - Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance - *Nature*, 2009 Sep 17;461(7262):399-401.
- [88] Thomas DL, Thio CL, Martin MP et al. - Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus - *Nature*, 2009 Oct 8;461(7265):798-801.
- [89] - Vijayaprakash Suppiah, Max Moldovan, Golo Ahlenstiel et al - IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy - *Nature Genetics*, 2009 Oct;41(10):1100-4
- [90] Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M et al - Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C - *Nature Genetics*, 2009 Oct;41(10):1105-9.
- [91] Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T et al - Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study - *Gastroenterology*, 2010 Apr;138(4):1338-45.
- [92] McCarthy JJ, Li JH, Thompson A et al - Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin - *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(7):2307-14.
- [93] Feld J, Hoofnagle J. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C2. *Nature* **2005**; 436:967–972.
- [94] Hofmann W, Herrmann E, Sarrazin C, Zeuzem S. Ribavirin mode of action in chronic hepatitis C: from clinical use back to molecular mechanisms. *Liver Int* **2008**; 28:1332–1343.
- [95] Yamamoto T, Kuniki K, Takekuma Y, Hirano T, Iseki K, Sugawara M. Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *Eur J Pharmacol* **2007**; 557:1–8.
- [96] Endres C, Moss A, Ke B, et al. The role of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in transport and metabolism of ribavirin by human and wild-type or Ent1(-/-) mouse erythrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**; 329:387–398.
- [97] Govindarajan R, Endres C, Whittington D, et al. Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative nucleoside transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2008**; 295:G570-G580.
- [98] Ibarra K, Pfeiffer J. Reduced ribavirin antiviral efficacy via nucleoside transporter-mediated drug resistance. *J Virol* **2009**; 83:4538–4547.
- [99] Jarvis S, Thorn J, Glue P. Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters. *Br J Pharmacol* **1998**; 123:1587–1592.

- [100] Fukuchi Y, Furihata T, Hashizume M, Iikura M, Chiba K. Characterization of ribavirin uptake systems in human hepatocytes. *J Hepatol* **2010**; 52:486–492.
- [101] **Morello, J., et al.** 2010. Influence of a single nucleotide polymorphism at the main ribavirin transporter gene on the rapid virological response to pegylated interferon-ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* **202**:1185–1191.
- [102] Sherman K, Shire N, Rouster S, et al. Viral kinetics in hepatitis C or hepatitis C/HIV-infected patients. *Gastroenterology* **2005**; 128: 313–327.
- [103] Chan A, Partovi N, Ensom M. The utility of therapeutic drug monitoring for ribavirin in patients with chronic hepatitis C—a critical review. *Ann Pharmacother* **2009**; 43:2044–2063.
- [104] Morello J, Rodriguez-Novoa S, Jimenez-Nacher I, Soriano V. Usefulness of monitoring ribavirin plasma concentrations to improve treatment response in patients with chronic hepatitis C3. *J Antimicrob Chemother* **2008**; 62:1174–1180.
- [105] Ge D, Fellay J, Thompson A, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **2009**; 461:399–401.
- [106] Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genomewide association study. *Gastroenterology* **2010**; 138:1338–1345.
- [107] Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet* **2009**; 41:1100–1104.
- [108] Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* **2009**; 41:1105–1109.
- [109] Rallo'n N, Naggie S, Benito JM, et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/HCV-coinfected patients. *AIDS* **2010**; 24(8):F23–F29.
- [110] Ibarra K, Pfeiffer J. Reduced ribavirin antiviral efficacy via nucleoside transporter-mediated drug resistance. *J Virol* **2009**; 83:4538–4547.
- [111] Gerrit J Viljoen, Louis H Nel, John R Crowther - Molecular diagnostic PCR handbook.
- [112] Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ - Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies - *Journal of Viral Hepatitis*, 2006;13:34–41.
- [113] WHO. Hepatitis C. Fact Sheet No. 164. Revised October 2000. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> (2000).
- [114] NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002.
- [115] Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto E et al - Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C - *Gastroenterology*, 2010;in press.
- [116] Abe H, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T et al - Common variation of IL28 affects intrahepatic expression of interferon stimulated genes and correlates with effect of peg-interferon and ribavirin combination therapy - *Journal of Hepatology*, 2010;52:S449.
- [117] Chen L, Boroza I, Feld J, Sun J et al - Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection - *Gastroenterology*, 2005;128:1437–44.
- [118] Feld JJ, Nanda S, Huang Y, Chen W et al - Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response - *Hepatology*, 2007;46:1548–63.
- [119] Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D et al - Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pre-treatment predictor of SVR in HCV-1 patients - *Gastroenterology*, 2010;in press.
- [120] Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES et al - Interferons α and λ inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics - *Gastroenterology*, 2006;131:1887–98.
- [121] Freeman JA, Zhang T, Holdren MS, Hausman DF - Peg-interferon λ (PEG-IL29): translation of in vitro preclinical data to clinical results - *Journal of Hepatology*, 2008;48:S294.

- [122] Shiffman M, Lawitz E, Zaman A, Vierling J et al - PEG-IFN-I: antiviral activity and safety profile in a 4-week phase 1b study in relapsed genotype 1 hepatitis C infection - Journal of Hepatology, 2009;50:S237.
- [123] Dodds MG, Hausman DF, Miller DM - Viral kinetic modelling during treatment with interferon lambda-1a in genotype 1 chronic hepatitis C patients - Journal of Hepatology, 2009;50:S342.
- [124] AnnMarie Liapakis and Ira Jacobson - Pharmacogenetics of hepatitis C therapy – Pharmacogenomics, 2010;11(2):135-139.